Fanconi Anämie als Modellsystem zur Kartierung selten auftretender Common Fragile Sites

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Kathleen Wilhelm
geboren am 03.08.1986 in Schmalkalden

Gutachter:

1: PD Dr. rer nat. / med. habil., Dr. h.c. Thomas Liehr, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Jena

2: Prof. Dr. med. habil. Thomas G. Wendt, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum Jena

3: PD Mag.Dr. Irmgard Verdorfer, Sektion für Klinische Genetik, Medizinische Universität Innsbruck

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.09.2014

Abkürzungen

Tabelle 0.1: Einheiten

Abkürzung	Bedeutung
h	Stunde
min	Minute
s	Sekunde
°C	Grad Celsius
g	Gramm
l	Liter
m	Meter
M	molar
mol	Mol, Stoffmenge
pH	Maß des sauren oder basischen Charakters einer Lösung, $pH= -\log_{10}(a_{H+})$

Tabelle 0.2: Metrische Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	Zehnerpotenz
G	Giga-	10^{9}
M	Mega-	10^{6}
k	Kilo-	10^{3}
c	Centi-	10^{2}
m	Milli-	10^{-3}
µ	Mikro-	10^{-6}
n	Nano-	10^{-9}
p	Pico-	10^{-12}
f	Femto-	10^{-15}

Tabelle 0.3: Sonstige verwendete Abkürzungen, Fortsetzung auf den folgenden Seiten.

Abkürzung	**Bedeutung**
3dSIM	Three-dimensional structured illumination microscopy
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AID	Activation-Induced Cytidine Deaminase
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
Alu	repetitive Elemente nach Restriktionsverdau mit *Arthrobacter luteus*
AML	Akute Myeloische Leukämie
Aph	Aphidicolin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATR	Ataxia Teleangiektasia and Rad3 related Proteinkinase
ATRIP	ATR Interacting Protein
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BFB	breakage-fusion-bridge, Modell der FSs-assoziierten Genamplifikation
Bio	Biotin-16-dUTP
BLM	Bloom Syndrom Protein, RecQ-Helicase-like
bp	Basenpaare
Bp	Bruchpunkt
BRCA1	breast and ovarian cancer sususceptibility protein 1
BrdU	Bromodesoxy-Uridin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca	Karzinom
CCD-Kamera	charge-coupled device-Kamera
CDC25A	Cell Division Cycle 25 Homolog A (*Schizosaccharomyces pombe*)
cep	Zentromer
CFS(s)	Common Fragile Site(s)
CHK1	Checkpoint Homolog *Schizosaccharomyces pombe* 1
chrb	Chromosomenbruch
chromat.	chromatisch
chtb	Chromatidbruch
C-Myc	Myelocytomatosis viral oncogene homolog, Protoonkogen
C-Programm	Anwendung, welche in Programmiersprache C geschrieben wurde
COP1	Constitutive Photomorphogenic Protein Gen
Cot1-DNA	Fraktion repetetiver humaner DNA
Cy 5	Cyanin 5
DAB1	Disabled Homolog 1 (*Drosophila*) Gen
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAC	Diethylaminocoumarin-5-dUTP
DEB	Diepoxybutan
Del	Deletion
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
Dig	Digoxigenin-11-dUTP
dist.	distal
DLBCL	Diffuse large B cell lymphoma, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleotidacid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease

Abkürzung	Bedeutung
dNTPs	Desoxy-Nukleotide
DOP	degenerierte Oligonukleotid-Primer
DOP-PCR	Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotid-Primern
ds	doppelsträngig
DS	Dextransulfat
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
ds-DNA	double-stranded DNA (doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure)
dTTP	2′-Desoxythymidin-5′-triphosphat
dUTP	2′-Desoxyuridin-5′-triphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERFS(s)	Early Replicating Fragile Site(s)
et al.	und andere Kollegen
$EtOH_{abs}$	Ethanol (absolut)
FA	Fanconi Anämie
FAAP24	Fanconi anemia-associated protein of 24kDa
FAAP100	Fanconi anemia-associated protein of 100kDa
FAN1	FANCD2/FANCI-associated nuclease 1
FANCA-P	Fanconi anemia complementation group protein A - P
FBS	Fötales Bovines Serum
FHIT	Fragile Histidine Triad Gen
FISH	Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS(s)	Fragile Site(s)
G	Guanosin
GTG	G-bands by Trypsin using Giemsa
H_2O	Wasser
HCl	Wasserstoffchlorid (in Wasser gelöst: Salzsäure)
hCLK2	humane CDC-like-Kinase 2
HNSCC	Head and Neck Sqamous Cell Carcinoma
ICL	Interstrand Crosslinks
IFAR	International Fanconi Anemia Registry
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
IMSID	Institut für Medizinische Statistik, Informatik, Dokumentation
Jh.	Jahrhundert
k.A.	keine Angabe
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
Ko	Kontrollperson
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LINE(s) (1, 2)	Long Interspersed Nuclear Element(s), repetitive(s) Element(e)
log	Logarithmus
LTR	Long Terminal Repeat, repetitives Element
Mbp	Megabasenpaare
MCB	Multicolor-Banding
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MET	Hepatocyte Growth Factor Receptor Gen
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MIR	Mammalian Interspersed Repetitive Elements, repetitive Elemente
MMC	Mitomycin C
n	Gesamtwert bzw. 100%
NaCl	Natriumchlorid

Abkürzung	Bedeutung
NaOH	Natriumhydroxid
NHEJ	Non-homologous End Joining
o.g.	oben genannt
OH-Ende	endständige Hydroxylgruppe
ORI	Origin of Replication, Replikationsursprung
OT	Objektträger (Einzahl)
OTs	Objektträger (Mehrzahl)
p	„petite“, kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
pcp	partial chromosome painting
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PHA	Phytohämagglutinin
PLK1	Polo-like Kinase 1
prox.	proximal
q	„queue“, langer Arm eines Chromosoms
R1-DNA	DNA-Produkt der ersten Reamplifikation
RAD17	RAD17 Homologon (*Schizosaccharomyces pombe*)
RAD51	RAD51, Protein der DNA-Reparatur durch homologe Rekombination
rb	Reunionsfigur
RFS(s)	Rare Fragile Site(s)
RMI1	RecQ-mediated genome instability protein 1
RMI2	RecQ mediated genome instability protein 2
RNA	Ribonucleotidacid (Ribonukleinsäure)
RNase A	Ribonuklease A, Endonuklease zur Aufspaltung einzelsträngiger RNA
ROS	Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauersoff-Spezies
RPA	Replikationsprotein A
RPMI 1640	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
SA	Streptavidin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SINE(s)	Short Intersperesed Nuclear Element(s), repetitive Element(e)
SMC1	SMC1 Structural Maintenance Of Chromosomes 1-Like 1 (Yeast)
sog.	sogenannt
ss-DNA	single-stranded DNA (einzelsträngige DNA)
SSC	Sodium Saline Citrat (Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat)
SSCTw	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat mit Tween 20
SSCTM	Milchpulver gelöst in Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat mit Tween 20
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*
TNR	Tenascin R Gen
Topo III α	Topoisomerase III α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Puffer)
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
t-RNA	transfer Ribonucleotidacid (Transfer-Ribonukleinsäure)
Tw bzw. Tween	Polyoxyethylensorbtianmonolaurat
U	Uridin
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
Ub	Ubiquitin
UBE2T	Ubiquitin-conjugating enzyme E2T
UPD	Uniparentale Disomie
UTP	Uridintriphosphat

Abkürzung	Bedeutung
UV	Ultraviolett
wcp	whole chromosome painting
WRN	Werner Syndrome, RecQ Helicase-Like
YAC	Yeast Artificial Chromosome
z.B.	zum Beispiel
ZL	Zelllinie(n)
zytogenet.	zytogenetisch

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1 Zusammenfassung

In zytogenetischen Untersuchungen steht die Beurteilung der Morphologie der Chromosomen im Vordergrund. Gelegentlich sind dabei chromosomale Bruchereignisse zu verzeichnen. Diese treten selten spontan bzw. nach Induktion durch spezifische Chemikalien (bspw. Aphidicolin) gehäuft im Bereich sog. „Fragile Sites“ (FSs) auf. Die gesteigerte Expression von Chromatidbrüchen ist das typische Charakteristikum der sog. Chromosomenbruchsyndrome. Ein solches Syndrom ist die Fanconi Anämie (FA), die durch Defekte in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) gekennzeichnet ist und mit einem erhöhten Risiko für Knochemarksversagen und maligne Erkrankungen einhergeht. In einer Studie der AG Molekulare Zytogenetik (Humangenetik Jena) zeigte sich, dass über 50% der Bruchereignisse im Material von FA-Patienten mit FSs zytogenetisch kolokalisieren. Zudem konnte für einige FSs die Kolokalisation zu Bruchpunkten, welche Teil von in humanen Tumoren beobachteten Translokationen sind, nachgewiesen werden. Dementsprechend gilt es FSs auch auf der Ebene der DNA-Sequenz zu untersuchen, um die Ursachen ihrer Fragilität aufzuklären. Die Kombination aus Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung spezifischer DNA-Sonden und anschließender Datenbank-Recherche erwies sich hierbei als geeignetes Verfahren. Bisher wurde nur ein kleiner Anteil der bekannten FSs auf diese Weise untersucht. Da FSs in ihrer Häufigkeit variieren, entziehen sich vor allem die selten Exprimierten einer derartigen Analyse. Allerdings konnte im FA-Material eine Abweichung der FSs-Expressionsraten beobachtet werden (Schoder 2009). Bruchereignisse im Bereich seltenerer FSs traten in diesem Material deutlich häufiger auf als in Aphidicolin-inkubierten Suspensionen. Die vorliegenden Arbeit überprüfte dies und nutzte den Umstand zur Etablierung der FA als Modellsystem zur molekular-zytogenetischen Kartierung selten auftretender CFSs. Zunächst erfolgte die zytogenetische Analyse der in FA-Material auftretenden Chromatidbrüche. Diese kolokalisierten zu 62,17% mit FSs. Anschließend konnten in Form einer Pilotstudie seltene CFSs des Chromosoms 1 (FRA1B, FRA1D, FRA1F, FRA1G und FRA1K) im Material von FA-Patienten kartiert und die Übertragbarkeit der ermittelten Daten im Aphidicolin-inkubierten Material gesunder Probanden überprüft werden. Die bereits bearbeitete FS FRA1E diente der Verifizierung des Verfahrens. Die Kartierung der FSs ermöglichte deren Untersuchung bezügliche des Gehalts an repetitiven DNA-Elementen und der Flexibilität der DNA, um die Fragilität näher zu beleuchten. Während der Gehalt an repetitiven Elementen der FS variierte, wiesen mit Ausnahme von FRA1F alle eine erhöhte Flexibilität auf. Die Fragilität der einzelnen FSs scheint durch eine individuelle Kombination fragilitätsfördernder Faktoren bestimmt zu werden. Zudem ermöglichte das Verfahren die Datenbank-Analyse der karierten FSs hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung für FA-Patienten. Es wird somit zur Bearbeitung selten exprimierter FSs empfohlen.

2 Einleitung

„Die Fähigkeit einer Zelle diese beschädigten Enden zu erkennen, sie zueinander zu führen und sie dann so zu vereinigen, dass der Verband der beiden DNA-Stränge korrekt orientiert ist, ist ein besonders deutliches Beispiel der Sensitivität von Zellen gegenüber alldem, was in ihnen vorgeht.“ (McClintock 1983)

Doch was geschieht, wenn die Zelle die beschädigten DNA-Enden nicht reparieren kann?
Die genetische Stabilität ist grundlegende Voraussetzung für alle lebenswichtigen Vorgänge innerhalb einer Zelle. Sie beeinflusst Stoffwechsel, Wachstum, Zellteilung und spezifische Zellfunktionen. DNA-Reparaturmechanismen gewährleisten die genetische Stabilität. Bei der Fanconi Anämie (FA) ist die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beeinträchtigt. Dies begünstigt die Entstehung von Chromosomenbrüchen, welche in Metaphasen-Untersuchungen beobachtet werden können. Infolge der Brüche kommt es gehäuft zu chromosomalen Fehlverteilungen, was zum Zellzyklusarrest oder zur malignen Transformation der Zelle führen kann (Heinrich *et al.* 1998, Meyer *et al.* 2012). Klinisches Korrelat dieser Vorgänge sind die hohen Inzidenzen des Knochenmarksversagens sowie der Akuten Myeloischen Leukämie bei FA-Patienten.
Chromosomenbrüche ereignen sich gehäuft in fragilen chromosomalen Regionen, welche 1965 erstmals beschrieben und später als „Fragile Sites“ (FSs) bezeichnet wurden (Dekaban 1965). In Abhängigkeit spezieller Kulturbedingungen (bspw. Zusatz von Aphidicolin) und der Häufigkeit ihres Auftretens in der Population werden „Common Fragile Sites“ (CFSs) von „Rare Fragile Sites“ (RFSs) unterschieden. FSs gelten in der Literatur als „hotspots“ chromosomaler Veränderungen. Sie kolokalisieren mit evolutionär konservierten Bruchpunkten (Bp) des humanen Genoms ebenso wie mit Bp chromosomaler Rearrangements (Ruiz-Herrera *et al.* 2002, Arlt *et al.* 2006). Die chromosomale Instabilität der FSs trägt somit ebenso wie jene, welche infolge des DNA-Reparaturdefekts bei FA-Patienten auftritt, zur malignen Karyotyptransformation bei (Gollin 2007).

Eine vorausgehende Studie der AG Molekulare Zytogenetik (Humangenetik Jena) zeigte, dass 50,58% der Chromosomenbrüche bei FA-Patienten zytogenetisch mit FSs übereinstimmen. Jedoch weisen die Brüche unterschiedliche Expressionsraten auf. Bp, welche im Material von FA-Patienten gehäuft auftreten, werden in Aphidicolin-inkubierten Suspensionen selten beobachtet (Schoder 2009). Die vorliegende Studie überprüft als Folgeprojekt die These, ob die veränderte Häufigkeit der FA-assoziierten Bp zur molekular-zytogenetischen Charakterisierung selten auftretender CFSs genutzt und so die FA als Modellsystem zur Kartierung dieser FSs etabliert werden kann.

2.1 Zytogenetik

Die Zytogenetik ist ein Teilgebiet der Genetik, welches die Untersuchung der Struktur, der Eigenschaften und des Verhaltens der Chromosomen mittels spezifischer Chromosomenfärbung während der Körperzellteilung (Mitose), des Wachstum, der Reifung und der Keimzellteilung (Meiose) beinhaltet, sowie deren Einfluss auf den Phänotyp beschreibt. Des Weiteren untersucht die Zytogenetik Ursachen und Faktoren chromosomaler Veränderungen (Hare und Singh 1979).

2.1.1 Grundlagen der Zytogenetik

1667 prägte Hooke den Begriff der Zelle, nachdem er diese Struktur mit Hilfe des Mikroskops am Material der Korkeiche beobachtet hatte (Hooke 1667). Es sollte jedoch über 150 Jahre dauern bis schließlich Schleiden und Schwann die Erkenntnis erlangten, dass sowohl Pflanzen als auch Tiere aus Zellen bestehen (Zelltheorie; Schleiden 1838, Schwann 1839). In den darauffolgenden Jahren beschrieb der Botaniker Carl Wilhelm von Nägeli in seiner Arbeit zu der Entwicklung von Pollen erstmals die sog. „transitorischen Zytoblasten“ als fadenähnliche Strukturen in den Kernen von Pflanzenzellen (von Nägeli 1842). Hinter diesem Begriff verbarg sich die Erstbeschreibung der Chromosomen (Thirumulu Ponnuraj und Bin Alwi 2009). 1855 erkannte Virchow „omnis cellula e cellula“ – eine jede Zelle geht aus einer Zelle hervor – und begründete die Theorie der Zellteilung (Virchow 1855). Die Beschreibung der Kernteilung durch Strasburger und Bütschli konnte diese Theorie bekräftigt (Strasburger 1875, Bütschli 1876). Flemming charakterisierte die einzelnen Abschnitte der Zellteilung, welche später von Strasburger als Pro-, Meta-, Ana- und Telophase sowie Mitose beschrieben wurden (Strasburger 1884). Die dabei beobachtete färbbare Substanz in den Zellkernen bezeichnete er als Chromatin (Flemming 1882). In Analogie dazu prägte Waldeyer 1888 den Terminus „Chromosom“, welchen er dem Griechischen „chromos“ (Farbe) und „soma“ (Körper) entlehnte (Waldeyer 1888). Rabl beobachtete, dass die Anzahl der Chromosomen während der Mitose bei jeder Art gleichbleibend ist und formulierte die Theorie der Konstanz der Chromosomen (Rabl 1885). Diese Theorie konnte durch van Beneden und Boveri bestätigt und um die Regeln zur Reduktion des Chromosomensatzes von $2n$ auf n während der Meiose erweitert werden (van Beneden und Neyt 1887, Boveri 1888). Zu Beginn des 20. Jh. fanden die „Mendelschen Regeln“ wissenschaftliche Beachtung. Bereits 1866 formulierte Gregor Mendel darin die Ergebnisse seiner Kreuzungsversuche mit Erbsenpflanzen in Form von sog. Vererbungsfaktoren und Vererbungsmustern (Mendel 1866). Sutton postulierte, dass das Verhalten der Chromosomen während der Meiose die morphologische Grundlage der „Mendelschen Regeln“ ist (Sutton 1903). Er begründete die „Chromosomentheorie der Vererbung“, welche von Boveri konkretisiert wurde und bis heute Gültigkeit besitzt. Die Chromosomen gelten darin als Träger der Erbinformation, welche bei der Befruchtung die Gene nach den Mendelschen Regeln vererben (Boveri 1903).

2.1.2 Methodische Fortschritte im 20. Jahrhundert

Die Etablierung neuer Techniken ermöglichte die weitere Aufklärung der chromosomalen Morphologie. 1952 entdeckte Hsu, dass eine hypotone Behandlung der Chromosomen die Metaphaseplatten (MPP) auflockert und deren Analyse erleichtert (Hsu 1952). Ford und Hammerton erkannten 1956, dass das im Gift der Herbstzeitlosen enthaltene Colchicin den Aufbau der Spindelfasern während der Mitose hemmt und so die Zelle im Metaphasestadium arretiert (Ford und Hammerton 1956). Im selben Jahr erlaubte die effektivere Chromosomenpräparation, die von Painter beschriebene Chromosomenzahl des humanen Karyotyps von 48 auf 46 Chromosomen zu korrigieren (Painter 1923, Tjio und Levan 1956). Die Effektivität der Chromosomenpräparation konnte 1960 durch die Erkenntnis, dass Phytohämagglutinin (PHA) die Teilung der T-Lymphozyten stimuliert, weiter gesteigert werden (Moorehead *et al.* 1960).

1959 wurden die ersten numerischen Chromosomenaberrationen beschrieben. Die Untersuchungen zur Trisomie 21, zum Turner-Syndrom und zum Klinefelter-Syndrom zeigten, dass chromosomale Verluste und Zugewinne ursächlich für bisher kausal ungeklärte Syndrome sind (Jacobs und Strong 1959, Ford *et al.* 1959, Lejeune *et al.* 1959). Dieser Zusammenhang bestätigte sich sowohl in der Beschreibung der Trisomie 13 als auch in der des Cri du Chat-Syndroms (Pätau *et al.* 1960, Lejeune *et al.* 1963). In den folgenden Jahren ermöglichte die Entwicklung verschiedener Methoden zur Bänderung von Chromosomen deren genauere strukturelle Charakterisierung. Diese Techniken finden bis heute Anwendung in der zytogenetischen Diagnostik und werden in Tab. 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Übersicht über die etablierten Bänderungsverfahren.

Bezeichnung	**Prinzip des Bänderungsverfahrens**	**Erstpublikation**
Q-Banding	Anfärben AT-reicher DNA-Abschnitte durch Quinacrin oder Quinacrindihydrochlorid	Caspersson *et al.* 1968
GTG-Banding	G-bands by Trypsin using Giemsa, Trypsinverdau der Präparate vor Giemsa-Behandlung	Seabright 1971
R-Banding	Reverse GTG-Banding, Denaturierung der Präparate durch Salzsäure vor Giemsa-Behandlung	Dutrillaux und Lejeune 1971
C-Banding	Anfärben heterochromatischer Chromosomenabschnitte, Denaturierung der Präparate durch Natriumhydroxid vor Giemsafärbung	Arrighi und Hsu 1971

Mit Hilfe der beschriebenen Verfahren konnten Aussagen bezüglich intrachromosomaler Veränderungen wie Deletionen (Verlust chromosomalen Materials), Duplikationen (Zugewinn chromosomalen Materials) und Inversionen (Drehung chromosomaler Abschnitte um 180°) sowie interchromosomaler Rearrangements wie bspw. Translokationen (Austausch chromosomalen Materials zwischen Chromosomen) getroffen werden (Thirumulu Ponnuraj und Bin Alwi 2009). Die 1978 erstmals erschienene ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) vereinheitlichte die Nomenklatur zur Beschreibung der Chromosomen. Sie wird regelmäßig

aktualisiert und spiegelt u.a. den wissenschaftlichen Standard zum Aufbau der Chromosomen nach GTG-Banding aus hellen und dunklen Banden, deren Nummerierung sowie die üblichen Bezeichnungen der Chromosomen- und Karyotypveränderungen wider (Shaffer und Tommerup 2005). Die konventionelle zytogenetische Beurteilung chromosomaler Veränderungen ist methodisch bedingt auf eine Auflösung von bis zu ca. 5 Millionen Basenpaaren begrenzt. Die Entwicklung der molekularen Zytogenetik ermöglichte eine präzisere Charakterisierung kleinerer chromosomaler Veränderungen bis zu einer Auflösungsgrenze von ca. 5 000 bis 500 000 Basenpaaren (Speicher und Carter 2005).

2.2 Molekulare Zytogenetik

Die molekulare Zytogenetik kombiniert die Methoden der Molekulargenetik mit denen der Zytogenetik. Hierbei findet unter anderem die Technik der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) Anwendung (Carpenter 2001). Diese Technik bedient sich der Markierung bestimmter Chromosomen oder chromosomaler Abschnitte und ermöglicht so deren Bewertung sowohl im Metaphasestadium als auch im Interphasekern (IK).

2.2.1 Entwicklung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Pardue und Gall etablierten 1969 die Methode der „*in situ* Hybridisierung“ radioaktiv markierter ribosomaler DNA-Sonden auf zytologischen Präparaten der Eier des Krallenfrosches *Xenopus* (Pardue und Gall 1969). Dieses Verfahren ermöglichte 1981 erstmals die Lokalisierung einzelner Gene (Gerhard *et al.* 1981, Harper und Saunders 1981, Malcom *et al.* 1981). Da die Methode zeitaufwendig und gesundheitsgefährdend war, wurde bereits 1980 von Bauman an einem Verfahren gearbeitet, welches die Verwendung nicht radioaktiver Sonden beinhaltete (Bauman *et al.* 1980). Die entscheidende Grundlage der nicht radioaktiven Markierung konnte schließlich 1981 mit der Konjugation des Haptens Biotin an Nukleotiden etabliert werden (Langer *et al.* 1981). Die Entwicklung der FITC-Avidin-Detektion für Biotin ermöglichte 1986 erstmals die FISH an humanen Chromosomen (Pinkel *et al.* 1986). Die Ergebnisse der Hybridisierung nicht radioaktiver Sonden wurden durch die Technik der Chromosomen *in situ* Suppressions-Hybridisierung (CISS) verbessert (Lichter *et al.* 1988). Diese Methode basiert auf einer Vorhybridisierung zum Abblocken repetitiver Sequenzen des Genoms und verhindert so eine unspezifische Hybridisierung der markierten Sonden an diesen Bereichen. 1989 wurden erstmals drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe parallel hybridisiert (Nederlof *et al.* 1989). Die Verwendung mehrerer Fluorochrome in Kombination ermöglichte die gleichzeitige Färbung aller Chromosomen mit Ganz-Chromosomen-Sonden („whole chromosome paint“, wcp). Die Weiterentwicklung und Kombination von wcp in den Verfahren des Spectral Karyotyping (SKY) und der Multiplex-FISH

(M-FISH) erlauben die Identifizierung eines Chromosoms anhand seiner spezifischen Fluorochrom-Kombination (Schröck *et al.* 1996, Speicher *et al.* 1996, Liehr *et al.* 2004).
In den folgenden Jahren konnte durch die Etablierung von FISH-Bänderungsverfahren wie bspw. dem „high resolution mulicolour banding“ (MCB) die Bandenauflösung auf 550 Banden pro haploiden Chromosomensatz verbessert werden (Chudoba *et al.* 1999, Liehr *et al.* 2002a, Weise *et al.* 2008). Eine weitere Voraussetzung zur Steigerung des Auflösungsvermögens der FISH-Technik war die Vollendung des „Human Genome Projects“ 2003. Durch dieses Projekt konnte das menschliche Genom mit Hilfe der sog. „Schrotschuss-Sequenzierung“ vollständig entschlüsselt werden (http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/about.shtml; Sanger *et al.* 1977, Staden 1979, Anderson 1981, Frazer *et al.* 2003). Die dabei vorgenommene Fragmentierung der humanen DNA-Sequenz ermöglichte die Etablierung Lokus-spezifischer Sonden (LSI-Sonden) zur Untersuchung der chromosomalen Struktur des menschlichen Genoms (Smeets 2004). Diese Sonden werden u.a. zur Bestimmung chromosomaler Bp verwendet.

2.2.2 Prinzip der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die FISH basiert auf der Bindung von markierter Proben-DNA an komplementäre Ziel-DNA und deren Auswertung mittels eines Fluoreszenzmikroskops. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Proben vervielfältigt und spezifisch markiert werden (Mullis 1986, 1987; Saiki *et al.* 1988). Unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotid-Primern wurde 1992 erstmals ein gesamtes Genom amplifiziert (DOP-PCR; Telenius *et al.* 1992). Diese Primer ermöglichen die randomisierte Amplifikation der ausgewählten Proben-DNA ohne, dass eine spezifische Primer-Sequenz zum Start der PCR notwendig ist. Während der Amplifikation werden entweder Fluorochrom-gebundene (direkte Markierung) oder Hapten-gebundene (bspw. Biotin, Digoxygenin; indirekte Markierung) Nukleotide zur Synthese verwendet. Ein alternatives Markierungsverfahren stellt die „Nick-Translation“ dar (Rigby *et al.* 1977). Hierbei werden Einzelstrangbrüche, sog. „nicks“, innerhalb der Proben-DNA durch die DNA-Polymerase I mittels Einbau direkt oder indirekt markierter Nukleotide repariert. Die markierte Proben-DNA wird unter Verwendung von Cot-1-DNA (siehe auch Abschnitt 4.7.2.3) denaturiert und liegt als Einzelstrang vor. Zeitgleich erfolgt eine Denaturierung der Ziel-DNA auf dem Objektträger (OT). Durch Aufbringen der Proben-DNA auf den OT erfolgt die Hybridisierung und somit die Anlagerung der Proben-DNA an die komplementäre Sequenz der Ziel-DNA. Die Verwendung direkt markierter Nukleotide während der PCR erlaubt eine sofortige Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abschnitt 4.7.3). Wurde die Proben-DNA indirekt, also mit einem Hapten markiert, erfordert dies eine anschließende Detektion mit Fluorochrom-markierten Antikörpern. Die Abbildung 2.1 aus dem Taschenlehrbuch Humangenetik stellt die FISH-Methode schematisch dar.

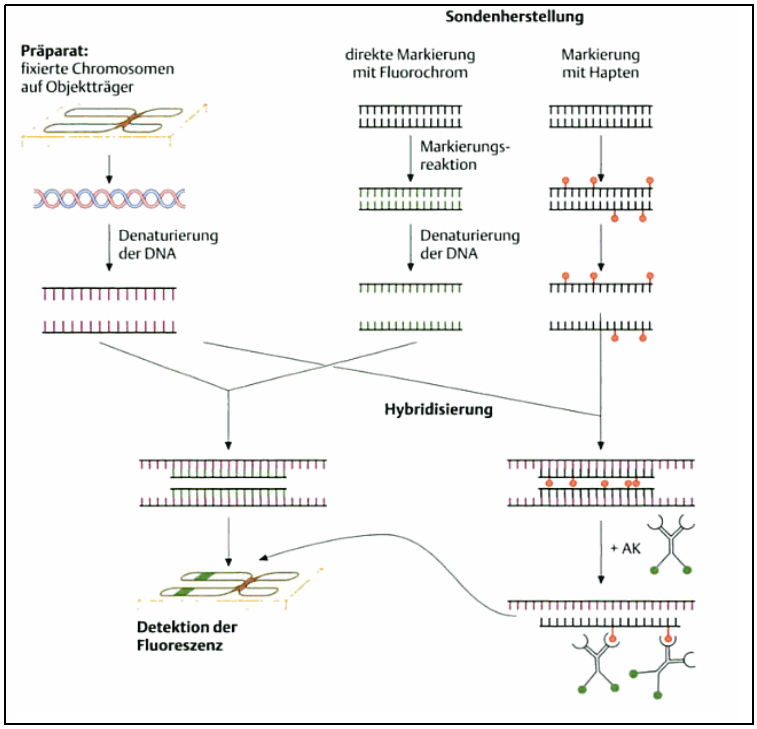


Abb. 2.1: Schema der FISH aus Speicher 2006.

2.2.3 Sondentypen

Die FISH-Technik erlaubt die Verwendung unterschiedlicher Sonden in Abhängigkeit der wissenschaftlichen Fragestellung. Die Methode des „chromosome flow sorting“ sowie die Mikrosezierung von Chromosomen ermöglichte die Etablierung verschiedener Sondentypen (Bates *et al.* 1986, Fantes *et al.* 1994, Senger *et al.* 1997). Zur Untersuchung ganzer Chromosomen werden Sonden des Typs „whole chromosome paints“ (wcp) verwendet. Die Hybridisierung führt zur vollständigen Markierung des ausgewählten Chromosoms. Liegt das Augenmerk auf Chromosomenarmen werden „chromosome arm specific paints“ bzw. „partial chromosome paints“ (pcp) Sonden eingesetzt. Diese markieren den jeweils ausgewählten kurzen (petit: p) oder langen (queue: q) Arm des Chromosoms (Waters *et al.* 1998).

Lokus-spezifische Sonden (LSI-Sonden) ermöglichen die Untersuchung kleinerer chromosomaler Abschnitte. Sie sind durch eine bestimmte DNA-Sequenz charakterisiert und können so chromosomale Strukturveränderungen aufzeigen. Diese DNA-Sequenz wird mittels eines Vektors in eine Wirtszelle eingebracht und dort vermehrt (siehe auch 4.6.1). Ein Portal des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verwaltet die Daten zu den existierenden LSI-Sonden und ist unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606 abrufbar.

2.3 Fragile Sites (FSs)

Chromosomale Regionen, deren Chromatin vor der Mitose nicht korrekt gefaltet wird, weisen eine erhöhte Disposition zu Chromatid- bzw. Chromosomenbrüchen auf und werden als Fragile Sites

(FSs) bezeichnet (Sutherland 2003). Dekaban beobachtete diese Bruchereignisse 1965 erstmals an humanen Chromosomen (Dekaban 1965). 1970 wurde der Begriff „Fragile Site“ (FS) zur Beschreibung von Chromosomenbrüchen am langen Arm des Chromosoms 16 eingeführt (Magenis *et al.* 1970). FSs können spontan auftreten, werden aber zumeist durch veränderte Bedingungen während der Lymphozytenkultivierung induziert (Sutherland 1979a, b, c). Sie sind in der Regel Loci, welche spät oder verzögert repliziert werden und infolge einer partiellen Inhibition der DNA-Replikation auch unvollständig repliziert in die Metaphase übertreten können (Hansen *et al.* 1997; Le Beau *et al.* 1998, Durkin und Glover 2007, Pelliccia *et al.* 2008). FSs werden in der Regel nicht in 100% der Metaphaseplatten eines Individuums beobachtet, sondern variieren in ihrer Expressionsrate (Schmid *et al.* 1986). In Abhängigkeit der Häufigkeit ihres Auftretens sowie der zur Induktion genutzten Kultivierungsbedingungen werden „Common Fragile Sites“ (CFSs, häufige FSs) von „Rare Fragile Sites“ (RFSs, seltene FSs) unterschieden (Sutherland *et al.* 1998). Mrasek *et al.* konnten allerdings nahezu alle Typen von bisher bekannten CFSs wie auch von RFSs nach Inkubation mit Aphidicolin beobachten und legen daher eine Änderung der Terminologie nahe (Mrasek *et al.* 2010). Dennoch soll hier sowohl auf die gegenwärtig gültige Unterscheidung zwischen CFSs und RFSs als auch auf die kürzlich entdeckten „Early Replicating Fragile Sites“ eingegangen werden (Barlow *et al.* 2013).

2.3.1 „Rare Fragile Sites“ (RFSs)

RFSs werden in weniger als 5% der Bevölkerung beobachtet und zumeist nach den Mendelschen Regeln vererbt (Durkin und Glover 2007). Derzeit sind 31 verschiedene RFSs bekannt, welche sich in ihrer Induzierbarkeit unterscheiden (Schwartz *et al.* 2006). Nicht-Folat-sensitive RFSs werden durch den Zusatz von Dystamycin A und/oder Bromoxyruidin (BrdU) während der Kultivierung induziert (Sutherland *et al.* 1980, Sutherland *et al.* 1984). Das molekulargenetische Korrelat der Bruchneigung dieser Untergruppe sind Expansionen AT-reicher Minisatelliten (Yu *et al.* 1997, Hewett *et al.* 1998). Die Mehrheit der RFSs ist jedoch durch Folsäure- oder Thymidinmangel während der Zellkultivierung induzierbar (Schwartz *et al.* 2006). Die erhöhte Bruchneigung dieser Regionen basiert auf der Expansion von Trinukleotid-Repeats (CCG/CGG) (Kremer *et al.* 1991). Diese Expansionen können klinisch relevant sein. So liegt die RFS in Xq27.3 (FRAXA) innerhalb des *FMR1*-Gens und führt zum Phänotyp des „Fragilen X-Syndroms“ (Verkerk *et al.* 1991).

2.3.2 „Common Fragile Sites“ (CFSs)

CFSs können definitionsgemäß in Zell-Suspensionen aller Individuen beobachtet werden und gelten daher als Teil der normalen Chromosomenstruktur (Arlt *et al.* 2003). Die Häufigkeit ihres Auftretens unterscheidet sich jedoch interindividuell und scheint zudem von Umweltfaktoren

beeinflusst zu werden (Denison *et al.* 2003). In Abhängigkeit von der Zählweise werden zwischen 89 und 230 CFSs unterschieden (Debacker und Kooy 2007, Mrasek *et al.* 2010). Die Mehrheit ist durch Inkubation der Zellkulturen mit Aphidicolin (Aph), einem Inhibitor der DNA-Polymerasen α, δ und ε induzierbar (Byrnes 1984, Sheaff *et al.* 1991, Cheng und Kuchta 1993). Nach Aph-Inkubation treten jedoch nicht alle CFSs in gleicher Häufigkeit auf. Brüche an 20 verschiedenen CFSs machen in Lymphozyten-Suspensionen 80% aller zu beobachtenden Bruchereignisse aus (Glover *et al.* 1984). FRA3B im Bereich von 3p14.2 ist hierbei die häufigste und FRA16D im Bereich von 16q23.2 die zweithäufigste CFS (Smeets *et al.* 1986, Casper *et al.* 2002). CFSs sind in der Regel zytogenetisch charakterisiert. Lediglich ein kleiner Anteil wurde molekular-zytogenetisch analysiert (siehe Bignell *et al.* 2010).

Mehrere Faktoren beeinflussen die Instabilität der CFSs. Ihnen allen ist eine Störung der Replikation gemein. Sequenz-Analysen vieler der bisher molekular-zytogenetisch charakterisierten CFSs zeigen einen relativ hohen AT-Gehalt, jedoch keine Repeat-Motive (Lukusa und Fryns 2008). Es handelt sich vielmehr um AT-reiche Inseln, welche einen sog. „Flexibility-Peak“ der DNA erzeugen und die Bildung sekundärer DNA-Strukturen, die die Replikation behindern können, begünstigen (Zlotorynski *et al.* 2003). Proteine, die an der Auflösung dieser Sekundärstrukturen beteiligt sind, beeinflussen die Stabilität der fragilen Regionen (Ozeri-Galai *et al.* 2012). Allerdings scheint nicht nur die Nukleotidsequenz der CFSs zur Instabilität beizutragen, da auch nicht fragile Regionen des Genoms ähnliche Basenabfolgen aufweisen (Helmrich *et al.* 2006). Vielmehr spielt die Organisation des Chromatins innerhalb der fragilen Bereiche eine Rolle. Das Chromatin zeichnet sich durch Hypoazetylierung der Histone und eine stärker kondensierte Struktur aus (Jiang *et al.* 2009). Auch die Ausdehnung der CFSs von bis zu 10 Mbp und die zum Teil enthaltenen großen Gene begünstigen die Fragilität (Smith *et al.* 2006, Curatolo *et al.* 2007). Schließlich beeinflusst die Replikation selbst die Fragilität (siehe Modell zur Expression der CFS in Abb. 2.2).

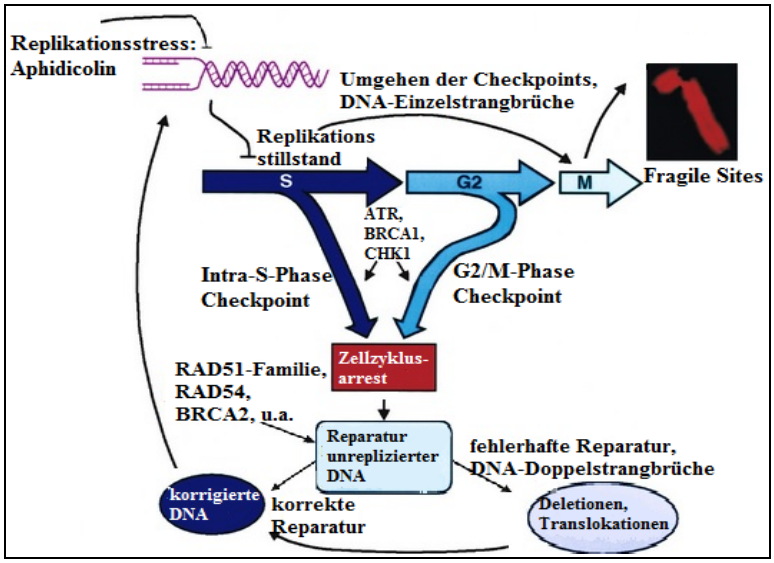


Abb. 2.2: Expression der CFSs. Verändert übernommen aus Casper *et al.* 2002.

Sie hängt dabei von der Anzahl der Replikationsursprünge und deren Aktivierungszeitpunkt ab (Debatisse *et al.* 2006, Le Tallec *et al.* 2011, Letessier *et al.* 2011). Steht die Replikationsgabel still, gewährleisten u.a. der ATR-Signalweg sowie die Proteine FANCD2 und BRCA1 deren Stabilität und das erneute Starten der Replikation (Casper *et al.* 2002, Schlacher *et al.* 2012). Eine Übersicht zu den Proteinen, welche unter Replikationsstress zur Stabilität der CFSs beitragen, findet sich bei Ozeri-Galai *et al.* (Ozeri-Galai *et al.* 2012). Die Reparatur eingetretener Bruchereignisse erfolgt im Wesentlichen durch homologe Rekombination sowie durch „Non-homologous End Joining“ (NHEJ, Schwartz *et al.* 2005).

2.3.3 „Early Replicating Fragile Sites“ (ERFSs, Barlow *et al.* 2013)

Als ERFS werden wiederkehrende, früh replizierte, von der „Activation-Induced Cytidine Deaminase“ (AID) unabhängige DNA-Läsionen der B-Lymphozyten bezeichnet. Es handelt sich um Loci, welche reich an ORI und Genen sind und einen hohen GC-Gehalt besitzen. ERFSs können spontane Brüche aufweisen. Ihre Stabilität hängt, wie die der CFSs, vom ATR-Kinase-Signalweg ab. Replikationsstress durch Inkubation der Lymphozyten mit Hydroxyurea, die Inhibition der ATR-Kinase, Defizite der homologen Rekombination und onkogener Stress (Deregulation von *C-Myc*) erhöhen die Instabilität. Bruchereignisse im Bereich von ERFSs sind als Bp an einigen der häufigsten chromosomalen Rearrangements im Material von diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) beteiligt. Infolge der Variabilität des Replikationszeitpunktes verschiedener genomischer Regionen innerhalb einzelner Zelltypen, könnten weitere ERFSs chromosomale Rearrangements innerhalb Neoplasien unterschiedlichsten zellulären Ursprungs bedingen.

2.3.4 Klinische Bedeutung der FSs: Erkrankungen, Onkogenese und Evolution

FSs sind in die Entwicklung von Krankheiten involviert. Mit Ausnahme von FRAXA und FRAXE sowie möglicherweise auch von FRA11B erhöhen sie jedoch nicht das Risiko kongenitaler Erkrankungen der Nachkommen (Sutherland und Baker 2000). Während RFSs vor allem mit Krankheitsbildern mentaler Retardierung assoziiert sind und ERFSs in der Entwicklung von DLBCL eine Rolle spielen, werden CFSs u.a. mit mehreren unterschiedlichen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht (Debacker und Kooy 2007, Barlow *et al.* 2013). CFSs sind als Bp oft in chromosomale Rearrangements involviert (Arlt *et al.* 2006). So kolokalisieren sie bspw. auf zytogenetischer Ebene zu 71% mit Bp konstitutioneller balancierter chromosomaler Rearrangements, welche zur Infertilität des Trägers führen, ebenso wie mit Bp von Deletionen und Translokationen verschiedener Neoplasmen (Krummel *et al.* 2000, Arlt *et al.* 2002, Liehr *et al.* 2011). Sie haben zudem Bedeutung als Ort der Rekombination sowie als Integrationsstelle viraler DNA und sind am Schwester-Chromatid-Austausch beteiligt (Glover und Stein 1987, Glover und

Stein 1988, Lukusa *et al.* 1991, Wilke *et al.* 1996, Mishmar *et al.* 1998). Zudem sind sie über das „Breakage-Fusion-Bridge“ - Modell (BFB) in intrachromosomale Genamplifikationen involviert (Coquelle *et al.* 1997). CFSs beeinflussen in vielfältiger Hinsicht die Integrität des Genoms und können zur Karzinogenese beitragen (Miró *et al.* 1987, Sankoff *et al.* 2002). So wird in präkanzerösen Läsionen der Verlust der Heterozygotie im Bereich von CFSs beobachtet (Halazonetis *et al.* 2008). Einige CFSs sind direkt mit Tumorsupressorgenen assoziiert, wie z.B. FRA3B mit dem *FHIT*-Gen (Iliopoulos *et al.* 2006). Eine Übersicht zu FSs-assoziierten Genen geben u.a. Durkin und Glover (Durkin und Glover 2007). FSs beeinflussen zudem die Variabilität des Genoms und trugen so zur Evolution der *Hominidae* bei. Der humane Karyotyp weicht durch chromosomale Veränderungen wie bspw. Inversionen und Fusionen von dem der Menschenaffen ab (Yunis und Prakash 1982, Mrasek *et al.* 2003). Die Bp dieser chromosomalen Umbauten gelten als evolutionär konserviert und kolokalisieren zytogenetisch mit FSs (Weise 2004).

2.4 Chromosomenbruchsyndrome

Erkrankungen, welche durch chromosomale Instabilität und daraus resultierenden Bruchereignisse gekennzeichnet sind, werden unter dem Begriff der Chromosomenbruchsyndrome zusammengefasst. Hierzu zählen bisher Ataxia teleangiektasia, Bloom Syndrom, Nijmegen Breakage Syndrom, Rothmund-Thompson Syndrom, Werner Syndrom, Xeroderma pigmentosum und Fanconi Anämie (FA) (Duker 2002, Neveling *et al.* 2007). All diesen Erkrankungen liegen Störungen im DNA-Metabolismus, der DNA-Reparatur, der Zellzyklus- oder der Apoptose-Kontrolle zu Grunde, was die chromosomale Instabilität und die erhöhte Inzidenz von Neoplasien bei Betroffenen zur Folge hat (Duker 2002). Die Syndrome weisen in ihrer klinischen Ausprägung progeroide Merkmale auf (Neveling *et al.* 2007). Sie können somit auch zur Aufklärung der Mechanismen des Alterns und der Karzinogenese beitragen.

2.5 Fanconi Anämie (FA)

Der Pädiater Guido Fanconi (1892-1979) beschrieb 1927 erstmals das Krankheitsbild der „familiären infantilen perniziosaartigen Anämie“ (Fanconi 1927, Lobitz und Velleuer 2006). Er berichtete in seiner Veröffentlichung über drei Brüder, die zwischen ihrem fünften und siebten Lebensjahr an einer fatal verlaufenden Anämie erkrankten und physische Auffälligkeiten aufwiesen. In den folgenden Dekaden wurden weitere Fälle von „Fanconi Anämie“ beschrieben (u.a. Uehlinger 1929, Imerslund 1953). Der Phänotyp des Syndroms zeigte sich eher heterogen, allerdings fiel ein erhöhtes Risiko der Patienten für die Entwicklung eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS), einer Akuten Myeloischen Leukämie (AML) oder bestimmter solider Tumoren auf (siehe auch 2.5.3; Fanconi 1967, Schroeder und Kurth 1971, Alter *et al.* 2000, Rosenberg *et al.* 2003). Im

Rahmen zytogenetischer Untersuchungen an Lymphozyten der FA-Patienten konnten schließlich Chromatidbrüche beobachtet und daraufhin die These der chromosomalen Instabilität postuliert werden (Schroeder *et al.* 1964, Schmid *et al.* 1965). Der Zusatz DNA-querverbindender Substanzen, wie bspw. Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB), während der Zellkultivierung steigerte die Bruchneigung der Chromosomen weiter und ermöglichte die Etablierung des Chromosomenbruchtest als diagnostische Methode (Sasaki und Tonomura 1973; Auerbach 1993, 2009; Oostra *et al.* 2012). Zudem bedingt die MMC- oder DEB-Exposition einen Anstieg des Anteils der Zellen, welche in der G2-Phase verbleiben. Dieser wird bei Untersuchungen des Zellzyklusarrests mittels Flusszytometrie gemessen und ebenfalls zur Diagnostik genutzt (Seyschab *et al.* 1995). 1980 wurden erstmals Zellfusions-Untersuchungen mit Zellen zweier FA-Patienten durchgeführt (Zakrzewski und Sperling 1980). Die resultierenden Zell-Hybride waren gegenüber DNA-querverbindenden Substanzen nahezu unempfindlich. Demnach verursachten mehrere Gendefekte die Hypersensitivität und die o.g. Methode eignete sich zur Bestimmung der Komplementationsgruppen (Chandra *et al.* 2005). Somit konnten bereits 1992 vier verschiedene FA-Gene nachgewiesen und das erste Gen, welches einer Komplementationsgruppe zu Grunde lag, charakterisiert werden (FANC-C, Strathdee *et al.* 1992a, Strathdee *et al.* 1992b). Die „Fanconi Anemia Mutation Database“ des International Fanconi Anemia Registry (IFAR) der Rockefeller Universität führt derzeit Daten zu 14 FA-Genen sowie einem FA-like Gen.

2.5.1 Molekulargenetischer Hintergrund – Genotyp

Die Inzidenz der FA beträgt 1:360000 bei einer geschätzten Heterozygotenrate von 1:300 und autosomal-rezessiven Erbgang (Swift 1971). Die Ratio von betroffenen Männern zu Frauen beträgt 1,2:1 (Alter und Kupfer 2012). FA tritt in allen ethnischen Gruppen und in bestimmten Populationen (bspw. Ashkenazi Juden) gehäuft auf (Kutler und Auerbach 2004). Die FA-Gene kodieren Proteine der unterschiedlichen Komplementationsgruppen und werden mit Ausnahme von *FANCB* autosomal-rezessiv vererbt (Schroeder *et al.* 1976). *FANCB* liegt auf dem X-Chromosom und folgt daher dem x-chromosomal-rezessivem Erbgang (Meetei *et al.* 2004). Tab. 2.2 zeigt eine Übersicht der FA-Genen. Die FA-Proteine bilden einen gemeinsamen Reparatur-Pfad welcher in Abb. 2.3 dargestellt wird („FA Pathway“, Moldovan und D'Andrea 2012). Sie wirken vor allem auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) infolge sog. „Interstrand Crosslinks“ (ICL) ein, spielen aber auch eine Rolle im Rahmen der zellulären Antwort auf oxidativen Stress (Taniguchi und D'Andrea 2006, Du *et al.* 2012). Dies erfolgt über die Beteiligung an der Aktivierung von S-Phase-Checkpoints, der Stabilisierung stillstehender Replikationsgabeln, der transläsionären DNA-Synthese nach nukleolytischer Inzision sowie an der homologen Rekombination zur Reparatur von DSB (Wang 2007, Moldovan und D'Andrea 2009, Kee und D'Andrea 2010, Schlacher *et al.* 2011).

Tabelle 2.2: Übersicht der Komplementationsgruppen. Modifiziert nach Kalb *et al.* 2007, Shimamura und Alter 2010 sowie Alter und Kupfer 2012 unter Verwendung der Fanconi Anemia Mutation Database.

Komplement-ationsgruppe	**Häufigkeit unter Betroffenen in %**	**Chromosomale Lokalisation**	**Gene**	**Protein in kDa**	**Referenz (u.a.)**
FA-A	60-70	16q24.3	*FANCA*	163	Lo Ten Foe *et al.* 1996
FA-B	~2	Xp22.3	*FANCB/FAAP95*	95	Meetei *et al.* 2004
FA-C	~14	9q22.3	*FANCC*	63	Strathdee *et al.* 1992b
FA-D1	~3	13q12.3	*FANCD1/BRCA2*	384	Hirsch *et al.* 2004
FA-D2	~3	3p25.3	*FANCD2*	155	Timmers *et al.* 2001
FA-E	~3	6p21-22	*FANCE*	58	de Winter *et al.* 2000a
FA-F	~2	11p15	*FANCF*	42	de Winter *et al.* 2000b
FA-G	~10	9p13	*FANCG/XRCC9*	68	de Winter *et al.* 1998
FA-I	~1	15q25-26	*FANCI*	140	Smogorzewska *et al.* 2007
FA-J	~2	17q22	*FANCJ/BRIP1/ BACH1*	140	Litman *et al.* 2005
FA-L	~0,2	2p16.1	*FANCL/PHF9*	43	Ali *et al.* 2009
FA-M	~0,2	14q21.3	*FANCM/Hef*	250	Meetei *et al.* 2005
FA-N	~0,7	16p12.2	*FANCN/PALB2*	131	Reid *et al.* 2007
FA-O	~0,2	17q22	*FANCO (FA-like)/RAD51C*	42	Vaz *et al.* 2010
FA-P	~0,2	16p13.3	*FANCP/SLX4*	200	Stoepker *et al.* 2011

Acht FA-Gene kodieren für Proteine (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL und FANCM), welche mit den Proteinen FAAP100 und FAAP24 den sog. „FA core complex“ bilden. FANCM erkennt in Assoziation zu FAAP24 DNA-Schäden, aktivert den ATR-Signalweg und führt den „FA core complex“ zum Chromatin. FANCL beinhaltet das katalytische Zentrum des „FA core complex“ und wirkt als E3-Ubiquitin-Ligase. Unter Mitwirken von UBE2T wird der sog. „ID complex“ aus FANCD2 und FANCI monoubiquitiniert (Wang 2007, de Winter und Joenje 2009, Alter und Kupfer 2012). Dies stabilisiert den „ID complex“ an stillstehenden Replikationsgabeln und ermöglicht die Assoziation des Komplexes mit „downstream“ gelegenen Proteinen (BRCA1, FANCD1, FANCN, RAD51, FANCJ) zu nukleären Foci der DNA-Reparatur. FANCD1 sowie FANCN steuern dabei die homologe Rekombination. FANCJ interagiert mit BRCA1, begünstigt in Assoziation zu BLM die Stabilisierung der Replikationsgabeln und aktiviert weitere Checkpoints. Auch der ubiqutinierte „ID complex“ initiiert weitere Reparaturmechanismen durch Rekrutierung von Endonukleasen (FANCP, FAN1) (Constantinou 2012).

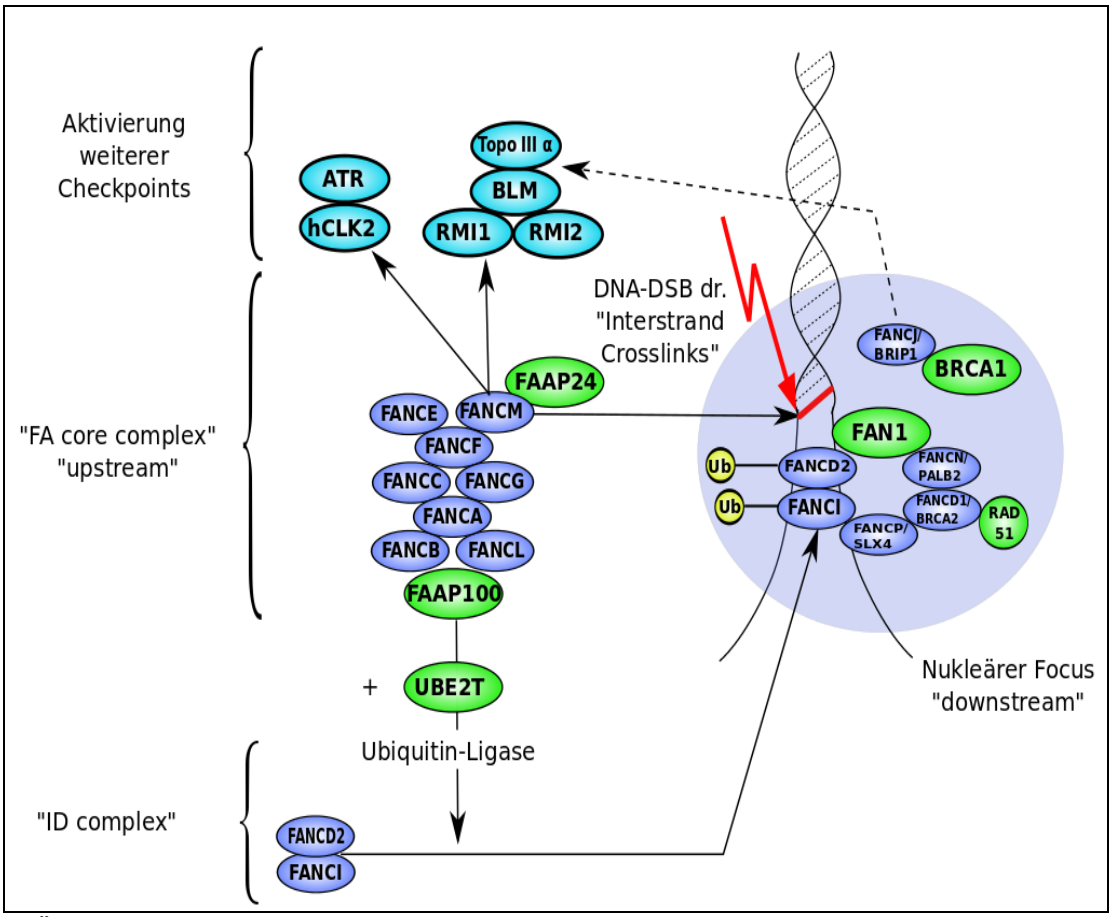


Abb. 2.3: Überblick des „FA-Pathway“ verändert nach Constantinou 2012. Legende: Dunkelblaue Symbole: FA-Proteine, hellgrüne Symbole: Proteine in direkter Assoziation zum FA-Pathway, hellblaue Symbole: weitere Checkpoint-Proteine, gelbe Symbole: Ubiquitinierung des „ID complex“.

2.5.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp der FA ist schwierig zu beurteilen. Innerhalb der FA-Gene können viele verschiedene Mutationen beobachtet werden. So zeigt die am häufigsten auftretende FA-Komplementationsgruppe FA-A ein weites Mutationsspektrum. Allein unter spanischen FA-Patienten wurden 130 veränderte FA-A-Allele identifiziert. Es treten Punktmutationen, kleinere Deletionen oder Insertionen, Spleiß-Mutationen und größere Deletionen auf (Castella *et al.* 2011b). Viele Mutationen gelten als „privat“, da sie bisher nur bei einem FA-Patienten beobachtet werden konnten. Dies und die hohe Prävalenz der Compound-Heterozygoten unter FA-Patienten limitieren die Genotyp-Phänotyp-Korrelation (Neveling *et al.* 2009). Zudem beeinflusst das Auftreten des sog. „Reversen Mosaizismus“ die Ausprägung der FA zusätzlich. Hierbei führen durch die genetische Instabilität begünstigte, neue Veränderungen innerhalb des krankheitsverursachenden FA-Gens zur Rückkehr zum Wildtyp-Gen und mildern somit den Verlauf (Gross *et al.* 2002). Der Mutationstyp (z.B. Missense- oder Nonsense-Mutation) hat einen größeren Einfluss auf den Phänotyp als das betroffene Gen. FA-D1 und FA-N sind von dieser Regel ausgenommen (Kalb *et al.* 2007).

2.5.3 Klinische Merkmale – Phänotyp

2.5.3.1 Angeborene Fehlbildungen

Angeborene Fehlbildungen treten in unterschiedlicher Häufigkeit und in unterschiedlichen Kombinationen auf. 40% der FA-Patienten weisen Kleinwuchs und Pigmentationsstörungen, wie Hyperpigmentation oder Café-au-laît-Flecken, auf. In ca. 25-30% der Fälle können skeletale Auffälligkeiten beobachtet werden. Hierbei handelt es sich vor allem um Mikrozephalie und Veränderungen des Daumens und Radius (bspw. Fehlen oder Hypoplasie). Auch eine elfenähnliche Fazies wird beschrieben (Kutler und Auerbach 2004). Fehlbildungen des Urogenitaltraktes, des Gastrointestinaltraktes, sowie des Herzens, der Ohren und der Augen treten ebenfalls auf. Einen Überblick hierzu geben Shimamura und Alter (Shimamura und Alter 2010).

2.5.3.2 Hämatologische Manifestation

Hämatologische Auffälligkeiten treten bei FA-Patienten im Mittel im Alter von 7 Jahren auf (Butturini *et al.* 1994). Meist sind Thrombozytopenie und Leukopenie die ersten Manifestationen. Sie gehen der Anämie voraus (Alter und Kupfer 2012). Die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen von FA-Patienten sind empfindlich gegenüber proinflammatorischen Zytokinen und oxidativem Stress und gehen in Folge dessen gehäuft in Apoptose (Dufour *et al.* 2003, Bijangi-Vishehsaraei *et al.* 2005, Du *et al.* 2008). Auch die unzureichende Reparatur von DNA-Schäden beeinträchtigt die Hämatopoese. Der p53/p21-Weg wird zu stark aktiviert und initiiert den Zellzyklusarrest zu häufig (Ceccaldi *et al.* 2012). Experimente an Knochenmark *ex vivo* legen die Vermutung nahe, dass die gesteigerte Apoptose einen Selektionsdruck auf bestimmte unempfindliche Klone ausübt. Diese zeigen meist zytogenetische Veränderungen und bergen ein erhöhtes Risiko der malignen Transformation (Li *et al.* 2005). Das Vorhandensein klonaler Veränderungen korreliert stark mit dem des Myelodysplastischen Syndroms (MDS, Cioc *et al.* 2010). Das relative Risiko der Entwicklung eines MDS ist bei FA-Patienten im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung etwa 5000-fach und das der AML ca. 500-fach erhöht (Alter *et al.* 2010).

2.5.3.3 Prädisposition zu soliden Tumoren

Das Risiko an soliden Tumoren zu erkranken, ist bei FA-Patienten ebenfalls erhöht. Es treten vor allem Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches (HNSCCs), des Ösophagus sowie des weiblichen Genitales auf. Während FA-Patienten mit vielen angeborenen Fehlbildungen bereits im frühen Kindesalter ein Knochenmarksversagen entwickeln, neigen FA-Patienten mit nahezu unauffälligem Phänotyp zur Entwicklung einer AML oder solider Tumore im jungen Erwachsenenalter (Rosenberg *et al.* 2004). Die Bedeutung von HPV-Infektionen im Rahmen der Karzinogenese wird kontrovers diskutiert (Kutler *et al.* 2003, van Zeeburg *et al.* 2008).

3 Ziel der Studie

In zytogenetischen Untersuchungen steht die strukturelle Integrität des Genoms im Fokus. Werden hierbei chromosomale Veränderungen wie bspw. Inversionen oder Translokationen beobachtet, so gelten diese als Zeichen gestörter genetischer Stabilität. Morphologischer Ausgangspunkt der genannten chromosomalen Umbauten sind häufig Chromosomenbrüche. Sie treten zumeist in bestimmten fragilen Regionen, den FSs, auf. Die Mehrheit der FSs bilden die sog. CFSs, welche als Teil der normalen Chromosomenstruktur gelten und die Variabilität des humanen Genoms beeinflussen. Jedoch weisen auch strukturelle Veränderungen, welche in Neoplasien beobachtet werden, häufig Bruchpunkte innerhalb CFSs auf. Es ist somit von Interesse CFSs mit Hilfe molekular-zytogenetischer Verfahren genauer zu charakterisieren, um die Ursachen der chromosomalen Fragilität besser beurteilen zu können. Bisher steht eine Sequenz-Analyse der meisten FSs noch aus. Vor allem selten auftretende CFSs entziehen sich dieser Untersuchung.

Im Material von Patienten, welche an einem Chromosomenbruchsyndrom leiden, werden Bruchereignisse besonders häufig beobachtet. In einer vorausgehenden Studie der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Bruchpunkte im Material von FA-Patienten zu 50,58% zytogenetisch mit FSs kolokalisieren. Es stellte sich zudem heraus, dass zwischen FSs und FA-Bruchpunkten eine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung besteht (Schoder *et al.* 2010). Tabelle 3 gibt einen Auszug der differierenden Expressionsraten der Bruchpunkte wieder.

Tab. 3: Vergleich beobachteter Häufigkeiten ausgewählter Aphidicolin-induzierter FS und FA-assoziierter Bruchpunkte. Tabelle verändert übernommen aus Schoder *et al.* 2010.

FS/ FA-Bruch	Häufigkeit in % bei FA-Patienten	Häufigkeit in % nach Aphidicolin
FRA3B	1,0	14,15
FRA16D	1,0	7,58
FRA1A	3,0	0,49
FRA1E/M	5,0	0,07

Selten auftretende CFSs sind somit möglicherweise im Material von FA-Patienten einer Untersuchung leichter zugänglich. Die vorliegende Studie ist als Folgeprojekt der Arbeit von Schoder angelegt (Schoder 2009). Es stehen folgende Fragen im Fokus: 1. Kann, basierend auf ausgedehnten zytogenetischen Untersuchungen FA-assoziierter Bruchereignisse, die FA als Modellsystem zur molekular-zytogenetischen Charakterisierung selten auftretender CFSs etabliert werden? 2. Können mit Hilfe der Sequenz-Analyse der untersuchten FSs die Hintergründe der chromoso-malen Fragilität weiter aufgeklärt werden? 3. Zeigt die Datenbank-Analyse Hinweise auf eine klinische Bedeutung der neu kartierten CFSs bei FA-Patienten? 4. Tritt die durch Schoder beobachtete Diskrepanz der FSs-Expressionsraten auch bei weiteren FA-Betroffenen auf?

4 Methodik

Im folgenden Kapitel werden die Untersuchungsmaterialien und die zur Beantwortung der Fragestellung verwendeten Techniken beschrieben.

4.1 Untersuchungsgegenstand

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fanden zytogenetisch aufgearbeitete Lymphozyten-Suspensionen von zwei FA-Patienten und zwei Kontrollpersonen sowie von zwei kommerziell erworbenen FA-Lymphoblastoid-Zelllinien Verwendung. Die Präparation erfolgte im Institut für Humangenetik der Friedrich-Schiller-Universität Jena nach dem Standardprotokoll von Verma und Babu (Verma und Babu 1995). Die Kulturen wurden nach dem Protokoll von Glover *et al.* mit Aphidicolin (Aph) behandelt (Glover *et al.* 1984). Die Induktion chromosomaler Bruchereignisse in Zellkulturen von FA-Patienten wurde mit Mitomycin C (MMC) in Anlehnung an Cervenka *et al.* durchgeführt (Cervenka *et al.* 1981).

4.1.1 Untersuchungsmaterial klinisch unauffälliger Probanden

Von den beiden Kontrollpersonen wurde eine leere Anamnese bezüglich FA-ähnlichen Auffälligkeiten erhoben. Aus Tabelle 4.1 können die klinischen Daten der Probanden entnommen werden.

Tab. 4.1: Übersicht des Untersuchungsmaterials von klinisch unauffälligen Probanden.

Proband	Material	Klinik	Alter und Geschlecht
Kontrollperson 1 (Ko_1)	Peripheres venöses Blut	unauffällig	22, ♀
Kontrollperson 2 (Ko_2)	Peripheres venöses Blut	unauffällig	23, ♀

4.1.2 Untersuchungsmaterial von FA-Patienten

Es wurde Material von vier FA-Patienten verwendet. Die beiden untersuchten Komplementationsgruppen sind jeweils durch Lymphozyten-Suspensionen und Suspensionen aus Lymphoblastoid-Zelllinien vertreten. Tabelle 4.2 gibt einen Überblick zu den Daten der Studienteilnehmer.

Bei jedem Studienteilnehmer wurde eine Anamnese bezüglich der Erkrankung eingeholt. Die Blutentnahme erfolgte durch den jeweiligen Hausarzt.

Tab. 4.2: Übersicht des Untersuchungsmaterials von FA-Patienten.

Proband	Material	Komplementations -gruppe	Mutation	Klinik	Alter und Geschlecht
FA-Patient 1 (FA_1)	Peripheres venöses Blut	FA-A	c.1567-1GC	Typischer Phänotyp	18, ♀
FA-Patient 2 (FA_2)	Lymphoblastoid-Zelllinie	FA-A	unbekannt	Typischer Phänotyp	10, ♀
FA-Patient 3 (FA_3)	Peripheres venöses Blut	FA-C	c.67delG (322delG)	Milder Phänotyp	21, ♀
FA-Patient 4 (FA_4)	Lymphoblastoid-Zelllinie	FA-C	c.67delG (322delG)	Typischer Phänotyp	19, ♀

Die Lymphoblastoid-Zelllinien wurden bei der Firma „CORIELL Institute for medical research“ erworben. „FA-Patient 2“ entspricht der Zelllinie GM13022 und „FA-Patient 4“ der Zelllinie GM12794. Weitere Informationen finden sich unter www.coriell.org.

4.1.3 Votum der Ethikkommission

Die vorliegende Studie wurde durch ein Votum der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der Nummer 2152-11/07 genehmigt. Studienleiterin ist Frau Dr. rer. nat. Anja Weise. Die Studienteilnehmer wurden über die Studie aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

4.1.4 Zur molekular-zytogenetischen Charakterisierung ausgewählte FSs

Zur Kartierung wurden FSs ausgewählt, welche nach Aphidicolin-Induktion eher selten auftreten (Tab. 4.3). Die Etablierung des Modellsystems der FA zur Charakterisierung der FSs erfolgt in Form einer Pilotstudie an CFSs des Chromosoms 1. Die ausgewählten FSs können Tabelle 4.3 entnommen werden. FRA1E ist eine bereits kartierte FS, die in dieser Studie zur Kontrolle der Methode genutzt wird.

Tab. 4.3: Zur Kartierung ausgewählte Bruchpunkte und deren zytogenetische Lage und Häufigkeit nach Aph-Induktion übernommen aus Mrasek *et al.* 2010.

FS/ FA-Bruch	Zytogenetische Lokalisation	Häufigkeit nach Aph-Induktion in %
FRA1B	1p32	1,491
FRA1D	1p22	0,009
FRA1E	1p21	0,067
FRA1F	1q21	0,098
FRA1G	1q25	0,799
FRA1K	1q31	0,138

4.2 Allgemeiner Versuchsablauf

Zur Kartierung der selten auftretenden FSs wurde ein Versuchsablauf etabliert, welcher in Abbildung 4.1 dargestellt wird.

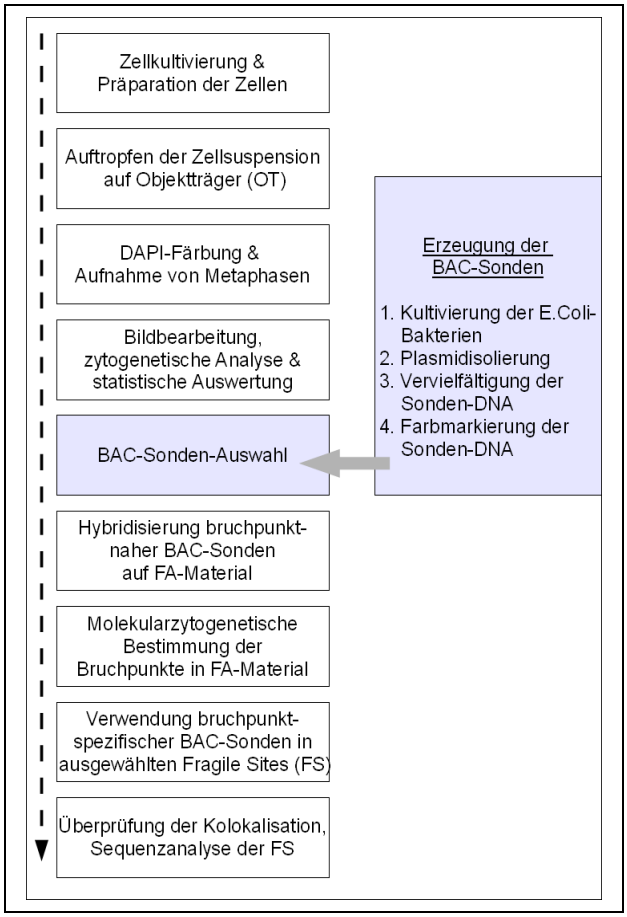


Abb. 4.1: Flussschema des allgemeinen Versuchsablaufs. Darstellung verändert nach Schoder 2009. Spezielle Untersuchungen werden in dieser Übersichtsdarstellung nicht einzeln aufgeführt.

Zunächst erfolgte die Zellkultivierung unter Zusatz von Aphidicolin (Aph) oder Mitomycin C (MMC) und die zytogenetische Aufarbeitung der Suspensionen. Im Anschluss daran wurden Objektträger (OTs) mit Suspension von FA-Patienten getropft. Die aufgetropften Metaphasen wurden zunächst mit 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Herstellung siehe Tab. 4.26) gefärbt. Die gefärbten OTs wurden dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes und der entsprechenden Auswertungs-Software, ISIS MetaSystems®, untersucht. Die Metaphasen (MPP) wurden auf diese Weise zytogenetisch beurteilt und die ermittelten Bruchpunkte für die statistische Auswertung notiert. Die Koordinaten, welche die Lage der MPP auf dem OT beschreiben, wurde festgehalten, um das erneute Aufsuchen der MPP zur weiteren Bearbeitung zu ermöglichen. Nach der zytogenetischen Analyse erfolgte die Auswahl der dem zu bearbeitenden Bruchpunkt (Bp) naheliegenden BAC-Sonden. Die OTs wurden entfärbt und die BAC-Sonden-Hybridisierung

durchgeführt. Nun erfolgte das nochmalige Aufsuchen der ausgewählten MPP am Fluoreszenzmikroskop und die Auswertung der Lage der BAC-Sonden. Zeigten die BAC-Sonden eine Lage innerhalb oder im Grenzbereich der FA-Bruchpunkte wurden diese Bruchpunkt-spezifischen Sonden zur Hybridisierung an FSs Aph-behandelter Metaphasen der Kontrollpersonen verwendet. Bei Kolokalisation erfolgte die Datenbankanalyse zur Charakterisierung der jeweiligen FS. Die folgenden Kapitel beschreiben die einzelnen Schritte des Versuchsablaufs.

4.3 Chromsomenpräparation

4.3.1 Präparation von Chromosomen aus Blut

Die Chromosomenpräparation erfolgte nach Verma und Babu (Verma und Babu 1995). In Abhängigkeit der Fragestellung wurden den Zellkulturen bestimmte Reagenzien zur Induktion von Chromosomenbrüchen zugegeben.

4.3.1.1 Kulturzusätze – Aphidicolin (Aph) und Mitomycin C (MMC)

Aphidicolin ist ein Antibiotikum welches u.a. im Pilz *Cephalosporium aphidicola* vorkommt und die DNA-Polymerasen α, δ und ε inhibiert und somit die DNA-Replikation beeinflusst (Byrnes 1984, Sheaff *et al.* 1991, Cheng und Kuchta 1993). Auf diese Weise wurden in den Zellkulturen chromosomale Bruchereignisse induziert. Es wurden nach 48h Kulturdauer 110µl der Aph-Lösung zu einer Endkonzentration von 0,2µmol/l den Zellkulturen zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 24h. Tabelle 4.4 zeigt die Herstellung der Aph-Lösung.

Tab.4.4: Herstellung der Aphidicolin-Lösung.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Hersteller**	**Erläuterung**
Aphidicolin-Lösung	Aph-Powder, ≥98%	Sigma-Aldrich®	1mg Aph-Powder in 147,9ml DMSO lösen, Endkonzentration: 0,2µmol/l, steril filtrieren, bei -20°C lagern
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich®	

Mitomycin C ist ein Antibiotikum, welches aus dem Bakterium *Streptomyces caespitosus* gewonnen wird. Nach Aktivierung durch körpereigene Reduktasen entsteht ein bifunktionales Alkylanz, das zwischen beiden Stränge der DNA interkaliert. Diese werden somit kovalent verknüpft, was Doppelstrangbrüche zur Folge hat (Paz *et al.* 1999). Innerhalb dieser Studie wurde MMC zur Induktion chromosomaler Bruchereignisse im Material von FA-Patienten angewendet. Es wurden nach 24h Kulturzeit 50µl der MMC-Lösung zu einer Endkonzentration von 50ng/ml hinzugefügt. Tabelle 4.5 gibt einen Überblick zur Herstellung der MMC-Lösung.

Tab. 4.5: Herstellung der MMC-Lösung.

Bezeichnung	Bestandteile	Hersteller	Erläuterung
MMC-Lösung	MMC	Sigma-Aldrich®	MMC in *Aqua ad iniectabilia* lösen, Stammlösung: 10µg/ml, Endkonzentration: 50ng/ml, Lagerung der Stammlösung bei -80°C
	Aqua ad iniectabilia	Braun®	

4.3.1.2 Kultivierung

Für die Kultivierung der Lymphozyten wurden 10ml RPMI-1640-Medium sowie 100µl Phythämagglutinin-Lösung (PHA) in eine sterile 50ml-Zellkulturflasche (Cellstar®, Greiner) gegeben und 1ml heparinisiertes Vollblut hinzugefügt. PHA ist ein aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) gewonnenes Lektin, welches spezifisch an Oberflächenrezeptoren der T-Lymphozyten bindet und so deren Wachstum stimuliert.

Tab. 4.6: Zur Kultivierung der Lymphozyten verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	Bestandteile	Hersteller	Erläuterung
RPMI-1640-Medium	RPMI 1640	Gibco®	500ml RPMI mit Glutamax-Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin + 60ml FCS (12%) + 5ml (Pen 10.000U/ml /Strep 10.000/ml)
	Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG®	
	Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom AG®	
PHA	Lyophilisiertes Phythämag-glutinin	Seromed®	Lyophilisiertes Phythämag-glutinin in 5ml *Auqa ad iniectabilia* gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert
	Aqua ad iniectabilia	Braun®	
Vollblut			heparinisiert
Colcemid		Seromed®	10mg/ml, Endkonzentration 0,1mg/ml

Die Kultivierung der Lymphozyten erfolgte für 72h bei 37°C und 5%iger CO_2-Begasung. Je Proband wurden drei verschiedene Zellkulturen angelegt und zeitgleich präpariert. Dabei wurden je einer Kultur kein reaktives Agens, einer Kultur nach 24h Kulturdauer 50µl der MMC-Lösung und einer Kultur nach 48h Kulturdauer 110µl der Aph-Lösung zugegeben.

1,5h vor Ablauf der Kultivierungszeit wurden je 100µl Colcemid (Seromed®) in das Medium der verschiedenen Zellkulturen gegeben. Colcemid ist ein Derivat des Alkaloids Colchicin, des Mitosegiftes der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*). Es bindet an die Mikrotubuli-Untereinheiten der Spindelfasern, so dass diese nicht mehr zum Aufbau des Spindelapparates zur Verfügung stehen. Die Zellen werden somit in der Metaphase der Mitose arretiert. Mit Hilfe dieser Behandlung wird die Ausbeute der Zellen, welche sich zur Präparation in der Metaphase befinden, gesteigert. Tabelle 4.6 gibt einen Überblick über die verwendeten Lösungen.

4.3.1.3 Präparation

Die zur Chromosomenpräparation benötigten Reagenzien werden in Tabelle 4.7 in Übersicht dargestellt.

Tab. 4.7: Zur Chromosomenpräparation verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Hersteller**	**Erläuterung**
Hypotone Kaliumchlorid-Lösung	Kaliumchlorid (KCl)	Merck®	0,556g KCl gelöst in 100ml *Aqua dest.* (mit Seralpur DELTA entionisiertes, partikelfreies, autoklaviertes Reinst-wasser)
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	
Fixativ	Methanol	Merck®	Methanol (96%) und Eisessig im Verhältnis 3:1 auf 4°C kühlen und nur frisch verwenden
	Eisessig	Merck®	

Zur Beginn der Präparation erfolgte ein vorsichtiges Aufschütteln der Zellkulturen in den Kulturflaschen und das Überführen des Inhaltes in 14ml Spitzröhrchen (Falcon®). Diese wurden anschließend für 5min bei 1500U/min (Megafuge 10, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch 10ml einer hypotonen KCl-Lösung, welche zuvor auf 37°C temperiert wurde, ersetzt. Die Sedimente wurden resuspendiert und für 20min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Behandlung bewirkt ein Anschwellen der Blutzellen. Dies führt zur Hämolyse der Erythrozyten. Die kernlosen und daher zur Chromosomenpräparation ungeeigneten Erythrozyten können so aus der Suspension entfernt werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Suspensionen durch Zugabe von je 1ml 4°C-kalten Fixativ präfixiert und für 5min bei 1500U/min zentrifugiert. Die lysierten Erythrozyten konnten mit dem Überstand abgesaugt werden. Das in den Spitzröhrchen zurückbleibende Sediment wurde mit je 10ml Fixativ resuspendiert und ein weiteres Mal für 5min bei 1500U/min zentrifugiert. Um Hämoglobin und Zellreste der Erythrozyten möglichst vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschschritt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wurden nochmals jeweils 10ml Fixativ zugegeben und resuspendiert. Die Suspensionen ruhten im Anschluss daran für 45min bei -20°C. Es erfolgte eine letzte Zentrifugation und ein weiteres Absaugen des Überstandes. Die verbliebenen Sedimente wurden je nach Dichte in 1 bis 2ml Fixativ aufgenommen und in 2ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Lagerung der Suspensionen bei -20°C, um die Depurinierung der DNA durch die im Fixativ enthaltene Essigsäure zu unterbinden.

4.3.2 Präparation von Chromosomen aus Zelllinien (ZL)

Es wurden zwei Lymphoblastoid-Zelllinien verwendet. Diese wurden vom Anbieter unter Verwendung des Eppstein-Barr-Virus (EBV) transformiert und immortalisiert (Neitzel 1986). EBV ist ein humanpathogenes Herpesvirus mit doppelsträngiger DNA, welches sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur Proliferation mononuklärer Zellen führt (Carbone *et al.* 2008).

Die ZL wurden durch den Hersteller „CORIELL Institute for medical research“ hinsichtlich einer Kontamination durch Bakterien, Mycoplasmen oder Pilze überprüft.

4.3.2.1 Kultivierung

Die ZL wurden in T25-Zellkulturflaschen, welche mit CO_2-gesättigtem RPMI-1640-Medium befüllt waren, verschickt. Nach Erhalt der ZL erfolgte zunächst deren Inkubation bei 37°C über Nacht. Im Anschluss wurde der Inhalt der Zellkulturflaschen in 50ml Falcon-Spitzröhrchen (Falcon®) überführt und 5min bei 22°C und 1200U/min zentrifugiert. Daraufhin konnte der Überstand abgenommen und das Sediment mit frischem RPMI-1640-Medium resuspendiert werden. Zur Herstellung des Zellkulturmediums für die ZL wurde ausschließlich Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum verwendet, um eine mögliche Immunreaktion durch Aktivierung des Komplementsystems zu verhindern. Die Inaktivierung erfolgte bei 56°C für 30min im Wasserbad (http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/Tipps_und_Hinweise/deutsch/100826_hintergrundinformation_hitzeinaktivierung.pdf). Tabelle 4.8 beschreibt die Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums. Die ZL wurden in sterilen 50ml-Kulturflaschen (Cellstar®, Greiner) zu je 10ml Kulturvolumen im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO_2-Begasung inkubiert. Das Kulturmedium wurde zwei Tage in den Kulturflaschen belassen und am dritten Tag gewechselt.

Tab. 4.8: Zusammensetzung des Zellkulturmediums der ZL.

Bezeichnung der Bestandteile	**Hersteller**	**Erläuterung**
RPMI 1640	Gibco®	500ml RPMI mit Glutamax-Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG®	75ml FCS (15%), Hitze-inaktiviert
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom AG®	5ml (Pen 10.000U/ml /Strep 10.000/ml)

Vor einer geplanten Chromosomenpräparation erfolgte eine Teilung der Zellkulturansätze, um eine zu hohe Zelldichte zu verhindern. Analog zur Chromosomenpräparation aus Vollblut wurden je Zelllinie drei verschiedene Kulturen (nativ, MMC-Inkubation für 48h sowie Aph-Inkubation für 24h) angelegt und deren Präparation durch Zusatz von je 100µl Colcemid (Seromed®) zum Medium 1,5h vor Ablauf der Kultivierungszeit initiiert. Nicht benötigte native Kulturansätze der ZL wurden

kryokonserviert. Die Zellen wurden für 5min bei 1500U/min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde anschließend unter Zugabe von 400µl RPMI 1640, 500µl FBS und 100µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich®) vorsichtig resuspendiert. DMSO diente dabei der Verhinderung der Eiskristallbildung. Danach erfolgte das schrittweise Einfrieren der ZL (4°C, -20°C über Nacht, -80°C für 2 Tage, flüssiger Stickstoff).

4.3.2.2 Präparation

Die Präparation der ZL erfolgte nach dem Protokoll in Abschnitt 4.3.1.3.

4.4 Präparation der Objektträger für weiterführende FISH-Analysen

Die Objektträger (OTs, Menzel-Superfrost®) wurden mit Seidenpapier gründlich gereinigt, in eine mit *Aqua dest.* gefüllte Küvette gegeben und bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Eine feuchte Kammer wurde im Trockenschrank bei 60°C vorgewärmt, um innerhalb der Kammer ein Mikroklima erhöhter Luftfeuchtigkeit zu erzeugen, was die Spreitung der Metaphaseplatten verbessert (Spurbeck *et al.* 1996, Hliscs *et al.* 1997). In die feuchte Kammer wurden die OTs schräg hineingestellt und ca. 20-30µl der ausgewählten Suspension in einem Abstand von ca. 60cm aufgetropft. Im Anschluss wurde frisch hergestelltes Fixativ nachgetropft, um Plasmareste abzuspülen. Die OTs trockneten auf einer 50°C warmen Heizplatte, welche mit feuchten Tüchern bedeckt war. Bei diesem Vorgang verdunstet das Methanol und die zurückbleibende Essigsäure entfaltet ihre hygroskopische Wirkung. Das aus der Umgebungsluft aufgenommene Wasser bewirkt eine Quellung der Chromosomen und macht diese sichtbar (Claussen *et al.* 2002). Anschließend wurden die getrockneten OTs mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 95%, $EtOH_{abs}$) dehydriert. Tabelle 4.9 beschreibt die zum Auftropfen der Suspensionen verwendeten Reagenzien.

Tab. 4.9: Zum Auftropfen der Suspensionen verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Hersteller**	**Erläuterung**
Fixativ	Methanol	Merck®	Methanol (96%) und Eisessig im Verhältnis 3:1 auf 4°C kühlen und nur frisch verwenden
	Eisessig	Merck®	
Aqua dest.		Seralpur DELTA Seral®	mit Seralpur DELTA entionisiertes, partikelfreies, autoklaviertes Reinstwasser
Ethanol-Reihe	Ethanol	ROTH®	Ethanol und *Aqua dest.* zu 70%- und 95%iger EtOH-Konzentration sowie $EtOH_{abs}$
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	

Frisch getropfte OTs wurden vor der Verwendung für FISH-Untersuchungen für ca. 2h bei 60°C im

Trockenschrank zur Alterung aufbewahrt. OTs, welche nicht sofort für Experimente benötigt wurden, konnten bei Raumtemperatur gelagert werden und waren ca. 3 Monate verwendbar.

4.5 Verwendete DNA-Sonden

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden verschiedene Sondentypen verwendet. Zumeist handelte es sich um BAC-Sonden, jedoch war zur Beantwortung bestimmter Fragestellungen auch die Verwendung der Multicolor-Bänderung (MCB), des M-FISH-Verfahrens (Multiplex-FISH) sowie kommerzieller Sonden nötig.

4.5.1 BAC-Sonden

Als „Bacterial Artificial Chromosome“ (BAC) wird ein modifiziertes Fertilitätsplasmid (F-Plasmid) des Bakteriums *Escherichia coli* bezeichnet, welches klonierte humane DNA mit einer Größe von bis zu 0,3Mb beinhaltet (Shizuya *et al.* 1992). Innerhalb dieses Plasmids ist zudem die Resistenz gegenüber einem bestimmten Antibiotikum kodiert. Der Zusatz dieses Antibiotikums während der Kultivierung gewährleistet die alleinige Anzucht der Plasmid-tragenden Bakterien.

In dieser Arbeit wurden BACs, welche Bestandteile des „Human Genome Projects“ sind, verwendet. Sie wurden von verschiedenen Anbietern käuflich erworben (CHORI: BACPAC Resource Center im Children's Hospital Oakland Research Institute, USA; Invitrogen; Sanger Institute: Welcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, England) oder freundlicherweise vom „Baylor College of Medicine“ in Houston zur Verfügung gestellt.

Die BACs wurden als „Agarstabs" geliefert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits®“ der Firma QIAGEN® aufgearbeitet. Die zur Kartierung verwendeten BACs werden im Kapitel „Ergebnisse“ unter der jeweils bearbeiteten FS aufgeführt.

4.5.2 Durch Mikrosezierung etablierte Sonden

Die durch Mikrosezierung etablierten Sonden, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, entstammen der Sonden-Bibliothek des Institutes für Humangenetik der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Sie wurden innerhalb früherer Projekte u.a. durch Prof. Dr. Uwe Claussen, Dr. Nikolai Rubtsov, Dr. Gabriele Senger, Dr. Vladimir Trifonov und Dr. Nadezda Kosyakova mittels Glasnadel-Mikrosezierung hergestellt. In dieser Arbeit fanden v.a. „whole chromosome painting“-Sonden (wcp) innerhalb der M-FISH und MCB-Banken Verwendung (Tab. 4.10). Die dabei genutzten Markierungsschemata zeigen die Abb. 8.1 sowie 8.2 des Anhangs.

Tab. 4.10: Verwendete Sonden, welche mittels Mikrosezierung etabliert wurden.

DNA-Banken von	Bezeichnung	Sondenart	Referenz
Chromosomenteilen	MCB-Banken des Chromosoms 11	Chromosomen-spezifischer MCB-Mix (siehe auch Abb. 8.1 des Anhangs)	Liehr *et al.* 2002b, Weise *et al.* 2003, Weise *et al.* 2008
Chromosomen	wcps aller Chromosomen	Chromosomen-spezifischer M-FISH-Mix (siehe auch Abb. 8.2 des Anhangs)	Speicher *et al.* 1996, Liehr *et al.* 2004 Anderson 2010

4.5.3 Kommerzielle Sonden

Zur Überprüfung einer im Mosaik vorliegenden Trisomie 9 eines Probanden wurde eine Zentromer-spezifische Sonden für das Chromosom 9 (cep9) sowie die Vysis LSI BCR-ABL Dual Color Sonde von Abbott® verwendet (http://www.abbottmolecular.com).

4.6 Molekulargenetische Techniken

Die molekulargenetischen Methoden wurden im Wesentlichen nach Sambrook und Russel durchgeführt (Sambrook und Russel 2001).

4.6.1 Präparation von BAC-Sonden

Die BACs wurden als *Escherichia coli* (*E.coli*) Kultur in Eppendorfröhrchen mit Agarose (Agarstabs) geliefert und in einem Labor der Sicherheitsstufe 1 (S1-Labor für die gentechnische Arbeit mit Mikroben, welche für gesunde Menschen und die Umwelt ungefährlich sind) bearbeitet. Es wurden *E.coli*-K12-Klone, also Klone eines apathogenen Sicherheitsstamms verwendet. Diese wurden bis zur Aufarbeitung bei 4°C gelagert.

4.6.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) unter Zusatz der Antibiotika Chloramphenicol oder Kanamycin. Dies gewährleistete die selektive Anzucht der Bakterien, welche BAC-Plasmide beinhalteten. Tabelle 4.11 beschreibt die Zusammensetzung des LB-Mediums.

Tab. 4.11: Zusammensetzung des LB-Mediums.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Hersteller**	**Erläuterung**
LB-Medium	*Aqua dest.*	Seralpur DELTA Seral®	In 900ml *Aqua dest.* werden 10g Bacto-Trypton, 10g NaCl sowie 5g Bacto-Yeast-Extrakt gelöst und der pH-Wert mit 10M NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wir das Volumen des Mediums mit *Aqua dest.* auf 1l aufgefüllt und autoklaviert.
	Bacto-Trypton	Merck®	
	NaCl	Roth®	
	Bacto-Yeast-Extrakt	Merck®	
Chloramphenicol	Chloramphenicol in Ethanol, 34mg/ml Stammkonzentration		Verwendung für RP11- und RP13-Klone mit Endkonzentration von 20µg/ml, Lagerung bei -20°C
Kanamycin	Kanamycin in *Aqua dest.*, 45mg/ml Stammkonzentration		Verwendung für RP1-, RP4- und RP5-Klone mit Endkonzentration von 25µg/ml, Lagerung bei -20°C

Es wurden je 5ml des mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB-Mediums in 50ml-Röhrchen (Falcon®) gegeben. Das Medium wurde dann mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens, welches kurz in den jeweiligen Agarstab eingetaucht wurde, angeimpft. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte auf einem Schüttler bei ca. 200U/min und 37°C über Nacht (12-16h). Nach Ablauf der Kulturzeit wurden je 750µl der LB-Kulturen mit je 750µl Glycerol versetzt, durchmischt und für eine Rekultivierung im Bedarfsfall bei -80°C gelagert. Das übrige Kulturvolumen stand zur Isolation der Plasmid-DNA zur Verfügung.

4.6.1.2 Isolation der Plasmid-DNA

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits®“ und des dazugehörigen Handbuchs (QIAprep Miniprep Handbook 2006, Protokoll: Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kits® and a Microcentrifuge) der Firma QIAGEN®. Das „QIAprep Spin Miniprep Kit®“ basiert auf der Methode der modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly 1979). Unter Verwendung der in Tab. 4.12 aufgeführten Lösungen wurden in mehreren Zentrifugationsschritten die Bakterien unter alkalischem pH lysiert und die somit frei vorliegende DNA unter Hochsalzbedingungen von einer Silicat-Gel-Membran adsorbiert. Anschließend wurde die DNA mit *Aqua ad iniectabilia* aus der Silicat-Gel-Membran eluiert (zu Einzelheiten der Plasmid-Isolation siehe QIAprep Miniprep Handbook 2006). Die Überprüfung der DNA-Konzentration der präparierten Proben erfolgte am Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000 bei 260nm. Die Proben standen nun zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion zur Verfügung und wurden nach Verwendung bei -80°C gelagert.

Tab. 4.12: Zur Isolierung der Plasmid-DNA verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Hersteller**	**Erläuterung**
Puffer P1	P1-Lösung	QIAGEN®	Vor Gebrauch RNase A zugeben und anschließend bei 4°C lagern
	RNase A (100mg/ml)	QIAGEN®	
Puffer P2		QIAGEN®	Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer N3		QIAGEN®	Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer PB		QIAGEN®	Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer PE	PE-Lösung	QIAGEN®	Vor Gebrauch $EtOH_{abs}$ zugeben und bei Raumtemperatur lagern
	$EtOH_{abs}$	ROTH®	
Aqua ad iniectabilia		Braun®	Steril, pyrogenfrei

4.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Technik, welche zur Amplifikation geringer DNA-Sequenzen *in vitro* genutzt wird (Saiki *et al.* 1988). Die zu vervielfältigende doppelsträngige „template“ DNA wird dabei unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus,* 5'→3'-Aktivität) mit Hilfe von Primern und Nukleotiden (Desoxynucleosidtriphosphate) amplifiziert. Tabelle 4.13 gibt eine Übersicht zu den verwendeten Reagenzien. Die PCR läuft in ca. 20-30 Zyklen im Thermocycler ab. Die Menge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz nimmt während dessen fast exponentiell zu. Ein PCR-Zyklus besteht aus den folgenden drei Arbeitsschritten:

1. Denaturierung: Bei 92-98°C wird die doppelsträngige „template“-DNA (dsDNA) in DNA-Einzelstränge (ssDNA) aufgetrennt.
2. „Anneling“: Das Abkühlen auf 37-70°C ermöglicht eine Anlagerung („annealing“) der Primer an die komplementäre Sequenz der ssDNA am 5'-Phosphat-Ende.
3. „Extension“: Bei Temperaturen von 70 bis 75°C erfolgt die DNA-Synthese mit Hilfe der Taq-Polymerase. Die ssDNA wird dabei unter Verbrauch von Nukleotiden vom 3'-OH-Ende der Primer aus zu dsDNA komplementiert.

Die Amplifikation der ausgewählten DNA-Sequenzen kann durch die verwendeten Primer beeinflusst werden. So vervielfältigen spezifische Primer nur definierte DNA-Sequenzen, während unspezifische Primer für die Amplifikation unbekannter Sequenzen oder gar des ganzen Genoms genutzt werden können. Die Abbildung 4.2 stellt den Ablauf der PCR schematische dar. Die Arbeitsschritte zur Vorbereitung der PCR wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt, um

Kontamination der PCR-Lösungen durch Fremd-DNA oder Nukleasen zu verhindern. Alle PCR-Zyklen erfolgten mit Hilfe des PCR-Gerätes PTC-200 der Firma MJ Research®.

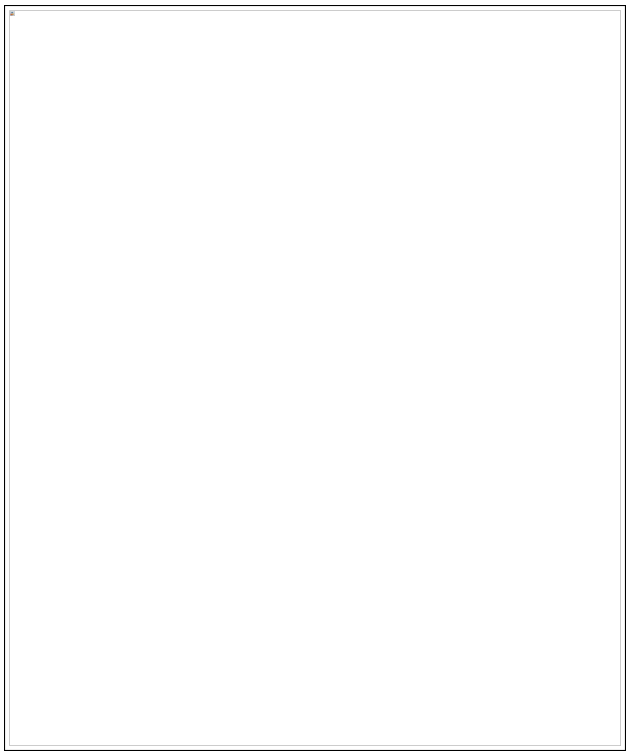


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der PCR. 1) Denaturierung, 2) „Annealing“, 3) Extension, 4) Ende des ersten Zyklus und exponentielle Vermehrung. (Grafik aus www.fsbio-hannover.de)

Tab. 4.13: Für die PCR verwendete Reagenzien. Fortsetzung auf folgender Seite.

Bezeichnung	**Hersteller**	**Erläuterung**
10xStoffel Fragment Puffer	Applied Biosystems®	100 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3
AmpliTaq® DNA-Polymerase	Applied Biosystems®	5 U/µl, in Kombination mit GeneAmp 10x PCR Puffer II verwendet
AmpliTaq® DNA-Polymerase Stoffel Fragment	Applied Biosystems®	10 U/µl, (= Stoffel Taq Polymerase) in Kombination mit 10xStoffel-Fragment-Puffer verwendet
Aqua ad iniectabilia	Braun®	Destilliert, steril, pyrogenfrei
dNTPs	Applied Biosystems®	GeneAmp dNTPs, 10mM; dATP:dCTP:dGTP:dTTP im Verhältnis 1:1:1:1 Stammlösung jedes Nukleotids: 2,5mM Endkonzentration jedes Nukleotids: 200µM
DOP-Primer	Dr. Birch-Hirschfeld, Jena	40µM
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäuredinatriumsalz)	Sigma-Aldrich®	0,5M, pH 8,0
GeneAmp 10x PCR Puffer II	Applied Biosystems®	100mM Tris-HCl; 500mM KCl pH 8,3

Bezeichnung	Hersteller	Erläuterung
Label-Mix	Applied Biosystems®	GeneAmp dNTPs, 10mM; dATP:dCTP:dGTP:dTTP im Verhältnis 2:2:2:1. Reduzierte dTTP-Konzentration zum präferierten Einbau modifizierter (Hapten/Fluorochrom-gekoppelter) Nukleotide.
$MgCl_2$ Solution	Applied Biosystems®	25mM
Sequenase Dilution Puffer	USB Corporation®	10mM Tris-HCl (pH7,5), 5mM DTT, 0,1mM EDTA
Sequenase Reaktion Puffer	USB Corporation®	5fach konzentriert: 200mM Tris-HCl (pH 7,5), 100mM $MgCl_2$, 250mM NaCl
Sequenase Version 2.0 DNA-Polymerase	USB Corporation®	13 U/µl

4.6.2.1 PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (DOP-PCR)

Die DOP-PCR basiert auf der Verwendung degenerierter Oligonukleotid-Primer. Die sogenannten DOP-Primer bestehen aus 20bp, wobei sechs zentrale unspezifische Nukleotide (N) von spezifischen Basen flankiert werden (Bohlander *et al.* 1992). Die Sequenz der verwendeten DOP-Primer weist folgendes Muster auf 5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'. Die Primer wurden durch Herrn Dr. E. Birch-Hirschfeld (Institute für Virologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Durch die Verwendung niedriger „Annealing"-Temperaturen (37°C) und der besonderen Sequenz der DOP-Primer wird die Amplifikation humaner DNA ungeachtet deren Basenabfolge ermöglicht. Die bakterielle DNA der Plasmide wird dabei nicht vervielfältigt. Tabelle 4.14 zeigt die verwendeten Lösungen.

Tab. 4.14: Zusammensetzung der für die DOP-PCR verwendeten Lösungen. Fortsetzung auf folgender Seite.

Bezeichnung	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration	Pro Sonde benötigtes Volumen in µl
Lösung A			
Aqua ad iniectabilia/ Plasmid			3,37
Sequenase Puffer	5x	0,6x	0,6
DOP-Primer	40,0µM	5,0µM	0,63
dNTPs	2,5mM	200µM	0,4
Gesamtvolumen			5,0
Lösung B (für 3 Zyklen)			
Sequenase	13U/µl	1,6U/µl	0,25
Sequenase Dilution Puffer			1,75
Gesamtvolumen			2,0
Lösung C			
Aqua ad iniectabilia			34,22

Bezeichnung	**Konzentration der Stammlösung**	**Endkonzentration**	**Pro Sonde benötigtes Volumen in µl**
Stoffel Fragment Puffer	1x	0,1x	5,0
dNTPs	je 2,5mM	220,0µM	4,4
DOP-Primer	40,0µM	1,1µM	1,38
$MgCl_2$	25,0mM	2,5mM	5,0
Gesamtvolumen			50,0
Lösung D			
Aqua ad iniectabilia			3,5
Stoffel Fragment Puffer	1x	0,1x	0,5
$MgCl_2$	25mM	2,5mM	0,5
Stoffel Taq Polymerase	10U/µl	1,0U/µl	0,5
Gesamtvolumen			5,0

Ein Thermocycler wurde in die sterile Werkbank gestellt und mit Hilfe von UV-Licht von Fremd-DNA befreit. Anschließend wurden die vier Gebrauchslösungen A,B,C und D vorbereitet. Pro Probe wurden 3,37µl Plasmid-DNA in ein 0,5ml Eppendorf-Röhrchen gegeben und 1,63µl der Lösung A hinzugefügt. Die Komponenten wurden kurz gemischt, abzentrifugiert, das Eppendorf-Röhrchen in den Thermocycler gestellt und die PCR mit einem initialen Denaturierungs-Schritt begonnen. Zunächst erfolgten drei Niedrig-Temperatur-Zyklen (25°C „Annealing“-Temperatur) mit der thermolabile Sequenase, an welche sich 32 Hoch-Temperatur-Zyklen (56°C „Annealing“-Temperatur) mit der thermostabilen Taq-Polymerase anschlossen. Tabelle 4.15 gibt die einzelnen Schritte der DOP-PCR wieder. Die amplifizierten Proben wurden mit je 1µl EDTA versetzt und bei -20°C gelagert.

Tab. 4.15: Arbeitsschritte der DOP-PCR. Fortsetzung auf der folgenden Seite.

Schritt	**Temperatur**	**Zeit**	**Erläuterung**
1	92°C	5'	Plasmid-DNA +Lösung A, Initiale Denaturierung
2	25°C	2'20"	Zugabe von 0,25µl der Lösung B, „Annealing“ der Primer
3	34°C	2'	Extension durch die Sequenase
4	90°C	1'	Denaturierung
5			Zweimalige Wiederholung der Schritte 2-4
6	30°C	2'20"	Zugabe von 45µl der Lösung C, „Annealing“ der Primer
7	92°C	1'	Denaturierung
8	56°C	2'20"	Zugabe von 5µl der Lösung D, „Annealing“ der Primer
9	70°C	2'	Extension durch die Stoffel Taq Polymerase
10	92°C	1'	Denaturierung

Schritt	Temperatur	Zeit	Erläuterung
11	56°C	1'	„Annealing der Primer“
12	72°C	2'	Extension durch die Stoffel Tag Polymerase
13			31fache Wiederholung der Schritte 10-12
14	4°C	∞	Stoppen der Reaktion und Kühlen des PCR-Produktes

4.6.2.2 PCR zur Reamplifikation des DOP-PCR-Produktes

Die in den Produkten der DOP-PCR enthaltene DNA wurde durch eine weitere PCR abermals amplifiziert. Dies diente der Gewinnung einer ausreichenden Menge an DNA, welche zur Markierung und Etablierung von BACs verwendet werden konnte, ohne dass nach kurzer Zeit eine erneute, aufwendige DOP-PCR nötig wurde. Die Reamplifikation erforderte die in Tabelle 4.16 beschriebenen Reagenzien. Pro Probe wurden 50µl des Reagenzien-Gemischs in ein 0,5ml Eppendorf-Röhrchen überführt und 1µl der DOP-DNA hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben gut durchmischt, abzentrifugiert und in den Thermocycler gegeben. Die PCR erfolgte nach dem Schema in Tabelle 4.17. Die so gewonnenen Proben (R1-DNA) wurden ebenfalls mit 1µl EDTA versetzt und bei -20°C bis zu ihrer Verwendung bei der Markierungs-PCR aufbewahrt.

Tab. 4.16 Zusammensetzung der zur Reamplifikation verwendeten Lösung.

Bezeichnung	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration	Pro Probe benötigtes Volumen in µl
Aqua ad iniectabilia			34,25µl
Stoffel Fragment Puffer	10x	1x	5µl
$MgCl_2$	25mM	2,5 mM	5µl
Stoffel Taq Polymerase	1 U/µl	0,1 U/µl	0,5µl
dNTPs	2,5mM	0,2 mM	4µl
DOP-Primer	40µM	1µM	1,25µl

Tab. 4.17: Schema der PCR zur Reamplifikation/Markierung.

Schritt	Temperatur	Zeit	Erläuterung
1	92°C	3'	Initiale Denaturierung
2	91°C	1'	Denaturierung
3	56°C	1'	„Annealing“ der Primer
4	70°C	2'	Extension durch die jeweilige Polymerase
5			29fache Wiederholung der Schritte 2-4
6	72°C	5'	Extension durch die jeweilige Polymerase
7	4°C	∞	Stop der Reaktion, Kühlen der PCR-Produkte

4.6.2.3 PCR zur Markierung der DNA

Die amplifizierte DNA wurde in einer weiteren PCR markiert. Die Markierung erfolgte durch den Einbau modifizierter Nukleotide. Diese waren entweder an Fluorochrome (direkte Markierung) oder an die Haptene Biotin oder Digoxigenin (indirekte Markierung) gekoppelt. Der Einbau der modifizierten Nukleotide wurde durch einen relativen Mangel an dTTP innerhalb des Label-Mix gewährleistet (dATP:dCTP:dGTP:dTTP = 2:2:2:1). Tabelle 4.18 gibt einen Überblick über die Fluorochrome und Haptene während Tabelle 4.19 die zur PCR verwendeten Reagenzien beschreibt. Zur Markierung einer Probe wurden 2µl der ausgewählten DNA-Bank mit 19µl des benötigten Reagenzien-Mix versetzt, durchmischt, abzentrifugiert und im Thermocycler nach dem in Tabelle 4.17 beschriebenen PCR-Programm amplifiziert.

Tab. 4.18: Zur Markierung der DNA verwendete Fluorochrome und Haptene.

Bezeichung	**Hersteller**
Fluorochrome	
Chroma-Tide-TexasRed-12-dUTP (TR)	Molecular Probes®
Diethylamino-Cumarin (DEAC)	NEN®, Life Science Products, Inc.
SpectrumGreen-dUTP (SG)	Abbott®
SpectrumOrange-dUTP (SO)	Abbott®
Haptene	
Biotin-16-dUTP (Bio)	Roche®
Digoxigenin-11-dUTP (Dig)	Roche®

Tab. 4.19: Zusammensetzung der Reagenzien für die Markierung einer DNA-Probe.

Bezeichnung	**Konzentration der Stammlösung**	**Endkonzentration**	**Pro Probe verwendetes Volumen in µl**
Aqua ad iniectabilia			12,08
10x PCR Puffer II	10x	2x	2,00
DOP-Primer		2,00 µM	1,00
Labelmix	10x	2x	2,00
$MgCl_2$	25mM	2,50mM	2,00
Modifiziertes Nukleotid	Nach Hersteller		1,00-2,00
AmpilTaq Polymerase	5 U/µl	0,03 U/µl	0,12

Pro Reaktionsansatz wurde entweder ein Hapten oder ein Fluorochrom verwendet. Die markierten DNA-Banken wurde anschließend entweder einzeln oder als zusammengefügter Mix gefällt (siehe 4.6.4). Im Anschluss an die Präzipitation der DNA erfolgte das Lösen in Dextransulfat (DS) und die Lagerung bei -20°C.

4.6.3 Nick-Translation

Die Nick-Translation ist eine seit 1977 etablierte Methode der DNA-Markierung (Rigby *et al.* 1977). Sie basiert auf der Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen („nicks“) an doppelsträngiger DNA durch die DNase I. Die Brüche entstehen an zufällig verteilten Stellen und erzeugen so freie 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Die DNA-Polymerase I aus *E.coli* nutzt die freien 3'OH-Enden als Primer und synthetisiert in 5'→3'-Richtung zum intakten Strang komplementäre DNA. Die Polymerase verfügt zudem über Exonuklease-Aktivität und verdrängt (translatiert) somit die in Syntheserichtung vorbestehenden Nukleotide. Diese Nukleotide werden durch Hapten-gekoppelte Nukleotide ersetzt. Zur Nick-Translation wurden Biotin- und Digoxigenin-Nick-Translations-Kits der Firma Roche® verwendet. Tab. 4.20 gibt die benötigten Reagenzien wieder. Es wurden 4µl der ausgewählten R1-DNA in ein 0,5ml Eppendorf-Röhrchen gegeben, 12µl *Aqua ad iniectabilia* und 4µl des ausgewählten Translations-Mix hinzugefügt, gemischt und im Thermocycler bei 15°C für 90 Minuten inkubiert. Die ablaufende Nick-Translation wurde durch Zugabe von 1µl 0,5M EDTA und zehnminütiger Inkubation im Thermocycler bei 65°C gestoppt. Anschließend wurde die DNA gefällt, in DS gelöst und bei -20°C gelagert (siehe 4.6.4).

Tab. 4.20: Für die Nick-Translation verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	**Hersteller**	**Erläuterung**
Aqua ad iniectabilia	Braun®	Steril, pyrogenfrei
Biotin-Nick-Translations-Mix für in situ Proben	Roche®	5fach konzentriert; enthält DNA-Polymerase I; Dnase I; je 0,25mM dATP, dCTP und dGTP; 0,17mM dTTP und 0,08 mM Biotin-16-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP
Digoxigenin-Nick-Translations-Mix für in situ Proben	Roche®	
R1-DNA		1µg in *Aqua ad iniectabilia*
EDTA	Sigma-Aldrich®	0,5M, pH 8,0

4.6.4 Präzipitation der DNA

Im Anschluss an die Markierungs-PCR bzw. Nick-Translation erfolgte die Alkoholpräzipitation der Proben, um diese zu konzentrieren und von überschüssigen PCR-Komponenten zu befreien. Die einzeln markierten Mikrosezierungsbanken der MCBs wurden vor dem Fällungsvorgang in 2ml Eppendorf-Röhrchen überführt und gemeinsam gefällt. Auch die einzelnen DNA-Komponenten des M-FISH-Mixes wurden vereinigt. Das Gemisch wurde mit den zur Präzipitation notwendigen Reagenzien versetzt und in 36 Einzelportionen gefällt.

Je DNA-Probe wurden 5µl Natriumacetat, 10µl t-RNA und das 2,5-fache des Gesamtvolumens $EtOH_{abs}$ verwendet. Zum Ausfällen der DNA-Mixe wurden die Volumina der Reagenzien entsprechend der zugrundeliegenden Sondenanzahl angepasst. Die Inkubation erfolgte bei -80°C für

20min oder bei -20°C über Nacht. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 15300 U/min für 20min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das zurückgebliebene Sediment unter Vakuum in der Speed Vac (Sevant®) bei 20°C getrocknet. Die getrocknete DNA wurde abhängig von der Sondenart in Dextranssulfat (DS) auf dem „Thermomixer 5437®“ (Eppendorf®) bei 37°C gelöst. Jede Portion des M-FISH-Mixes wurde in je 24µl DS, MCB-Mixe in 25µl DS und einzelne DNA-Sonden in 60µl DS gelöst. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C. Tabelle 4.21 gibt die Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien wieder.

Tab. 4.21: Zusammensetzung der für die DNA-Präzipitation verwendeten Reagenzien.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Hersteller**	**Erläuterung**
$EtOH_{abs}$	Ethanol	ROTH®	
Natriumacetat	Natriumacetat, wasserfrei	Sigma®	3 M, 24,6g Natriumacetat in 100ml *Aqua dest.* lösen, pH-Wert mit Eisessig auf 5,2 einstellen
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	
	Eisessig	Merck®	
t-RNA	t-RNA aus *E.coli*	Boehringer®	Stammlösung: 10µg/µl
Dextransulfat (DS)	Dextransulfat Pulver	Sigma-Aldrich®	2g Dextransulfat Pulver mit 2ml 20xSSC, 2ml Natriumphosphat und 5ml deionisiertem Formamid versetzten, mit *Aqua dest.* zu 10ml auffüllen und 3h bei 70°C lösen
	20xSSC	Gibco BRL®	
	Natriumphosphat 0,5M	Merck®	
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	
	Formamid, deionisiert	Merck®	

4.7 Methoden der Molekularen Zytogenetik

Die molekular-zytogenetischen Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach Liehr 2009 angewendet und ggf. modifiziert (Liehr 2009).

4.7.1 Vorbehandlung der Objektträger (OTs) zum Auffinden der Bruchpunkte

Zunächst wurden kleine Mengen (ca. 30µl je OT) der Probanden-Suspensionen auf OTs getropft und diese wie beschrieben gealtert (siehe 4.4). Die OTs wurden anschließend mit DAPI (siehe Tab. 4.26) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich chromosomaler Bruchereignisse untersucht. Metaphaseplatten, welche einen zu charakterisierenden Bruchpunkt (Bp) aufwiesen, wurden mit einer an das Fluoreszenzmikroskop gekoppelten CCD-Kamera aufgenommen und mittels spezieller Software (ISIS, MetaSystems®) bearbeitet. Die Koordinaten der jeweiligen Metaphasen des OT wurden für weitere Untersuchungen notiert. Die vollständig analysierten OTs wurden in einer mit $EtOH_{abs}$ gefüllten Küvette für 10min auf einem Schüttler (Vibramax 100,

Heidolph Instruments®) gewaschen und so von DAPI-Rückständen befreit. Die entfärbten OTs standen dann für die Hybridisierung zur Verfügung.

4.7.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Das Prinzip der FISH basiert auf der spezifischen Hybridisierung ausgewählter DNA-Sonden an deren komplementären DNA-Bereich im Untersuchungsmaterial auf dem OT. Die Hybridisierung wird durch die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Arbeitsschritte ermöglicht.

4.7.2.1 Pepsinbehandlung der OTs

Nach dem Auftropfen sind die Chromosomen von eiweißhaltigen Zytoplasmabestandteilen umgeben. Diese Proteine können als unspezifische Bindungspartner mit den zur Detektion eingesetzten Antikörpern interagieren und somit die Qualität der Hybridisierung negativ beeinflussen. Aufgrund dessen müssen die Zytoplasmareste vor der Hybridisierung enzymatisch abgebaut werden. Hierzu wurde die Protease Pepsin, das führende Verdauungsenzym des Magens der Wirbeltiere, verwendet. Um das für die Enzymaktivität optimale Milieu zu schaffen, wurden 100ml einer 10mM HCl-Lösung in einer Küvette auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden 500µl der Pepsin-Stammlösung zugegeben und die OTs sofort danach für 5min in der Lösung inkubiert. Die Inkubationszeit galt es strikt einzuhalten, da die Integrität der Chromosomenstruktur durch die Protease beeinträchtigt wird. Die OTs wurden auf einem Schüttler (Vibramax 100, Heidolph Instruments®) für 5min in einer mit 1xPBS-Lösung gefüllten Küvette gewaschen und so von Pepsinrückstanden befreit. Zur Fixierung der Chromosomen wurden 100µl einer formaldehydhaltigen Postfixierungslösung auf ein Deckglas (24mm x 60mm) gegeben und der OT mit diesem für 10min bei Raumtemperatur bedeckt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Deckglas entfernt und der OT nochmals auf dem Schüttler für 5min in einer mit 1xPBS-Lösung gefüllten Küvette gewaschen. Abschließend wurden die OTs mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, $EtOH_{abs}$ für je 3min, siehe Tab. 4.10) dehydriert. Tabelle 4.22 gibt die für die Pepsinbehandlung verwendeten Reagenzien wieder. Sollten Präparate von Suspensionen mit fragilen Chromosomen (Suspensionen von FA-Patienten, Aphidicolin-behandelte Suspensionen) bearbeitet werden, so erforderte dies eine initiale Fixierung mit der in Tab 4.22 beschriebenen Postfixierungslösung. Hierbei wurden die OTs zunächst in 1xPBS-Lösung für 5min auf dem Schüttler (Vibramax 100, Heidolph Instruments®) gewaschen und anschließend die oben beschriebenen Fixierungs-, Wasch- und Dehydrierungsschritten durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte die eigentliche Pepsinbehandlung in unveränderter Weise.

Tab. 4.22: Zur Pepsinbehandlung verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Hersteller**	**Erläuterung**
1xPBS-Lösung	„phospate buffered saline“ (PBS)	Biochrom AG®	9,55g/l; 47,75g PBS in 5l *Aqua dest.* lösen;
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	
HCl-Lösung	0,2n HCl	Merck®	10mM HCl; 5ml der 0,2n HCl mit 95ml *Aqua dest.* versetzen
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	
Pepsin-Lösung	Pepsin	Sigma-Aldrich®	Pepsin-Stammlösung: 1g Pepsin in 50ml *Aqua dest.* lösen
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	
Postfixierungs-Lösung	Paraformaldehyd-Pulver	Sigma-Aldrich®	500µl Paraformaldehyd (2g Paraformaldehyd-Pulver) mit 100ml 1xPBS-Lösung und 10µl 1N NaOH versetzen und bei 70°C 1h lösen, dann 450µl 1xPBS-Lösung und 50µl $MgCl_2$ hinzugeben
	1x PBS-Lösung	Biochrom AG®	
	NaOH	Merck®	
	$MgCl_2$	Merck®	

4.7.2.2 Denaturierung der Ziel-DNA

Um eine Hybridisierung zu ermöglichen müssen sowohl Ziel- als auch Sonden-DNA als Einzelstränge, also denaturiert, vorliegen. Die Denaturierung geschieht gewöhnlich bei 90-100°C und geht mit Veränderungen der chromosomalen Morphologie einher. Durch Zugabe von Formamid kann die Denaturierung der DNA bereits bei niedrigeren Temperaturen erreicht und so die Chromosomenstruktur geschont werden. Formamid destabilisiert die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den DNA-Strängen und erleichtert deren Trennung. Die Pepsin-behandelten OTs wurden auf einer 72°C warmen Heizplatte (HP 30 digital, IKA Labortechnik®) unter einem Abzug angewärmt und anschließend mit Hilfe eines Deckglases (24mm x 60mm) mit 100µl einer 70%igen Formamidlösung überschichtet (Tab. 4.23). Die Inkubationszeit betrug in der Regel 3min, konnte aber im Rahmen mehrmaliger Hybridisierungen eines OTs in 30-Sekunden-Schritten bis auf 5min ausgedehnt werden. Nach der Inkubation wurde das Deckglas entfernt, der OT in -20°C kaltes 70%iges Ethanol überführt und darin für 3min belassen. Auf diese Weise wurde die Renaturierung der DNA verhindert. Die begonnen Dehydrierung wurde bei Raumtemperatur mit dem jeweils dreiminütigen 95%-Ethanol- und $EtOH_{abs}$-Schritt fortgeführt. Anschließend trockneten die OTs bei Raumtemperatur und wurden innerhalb der nächsten 30min mit der ausgewählten denaturierten Sonden-DNA hybridisiert.

Tab. 4.23: Zur Herstellung der Formamid-Lösung verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Hersteller**	**Erläuterung**
Formamid-Lösung	Formamid	Merck®	140ml Formamid mit 20ml 20xSSC und 40ml *Aqua dest.* versetzten. PH-Wert mit 1N HCl auf pH7,0-7,5 einstellen, Lagerung bei 7°C
	20xSSC	GibcoBRL®	
	Aqua dest.	SeralpurDELTA Seral®	
	1N HCl	Merck®	

4.7.2.3 Denaturierung und Prehybridisieren der Sonden-DNA

Die Denaturierung der Sonden-DNA erfolgte unter Anwesenheit von Cot-1 DNA. Cot-1 DNA ist eine Fraktion genomischer DNA, welche repetitive Sequenzen in hoher Konzentration enthält. Sie wird zum Blockieren (Prehybridisieren) der repetitiven Teile der Sonden-DNA genutzt, um durch unspezifische Hybridisierungen bedingte Hintergrundsignale zu verhindern. Tabelle 4.24 gibt die zur Denaturierung der Sonden-DNA verwendeten Reagenzien wieder.

Tab. 4.24: Zur Denaturierung und Prehybridisierung verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Hersteller**	**Erläuterung**
Cot-1 DNA	Cot-1 DNA, 1µg/ml	Roche®	In 0,5ml Eppendorf-Röhrchen 10µl Cot-1 DNA mit 20µl $EtOH_{abs}$ versetzen und in Speed Vac (Sevant®) eintrocknen, bei -20°C lagern. (= 10ng Cot-1 DNA)
	$EtOH_{abs}$	ROTH®	
Dextransulfat (DS)		Sigma-Aldrich®	Siehe Tab. 4.20.

Es wurde mit verschiedenen Sonden gearbeitet, weshalb die Zusammensetzung des Reagenzien-Gemisches variierte. Zur Hybridisierung von 1/3 bis ½ eines OT wurden die in Tabelle 4.25 beschriebenen Reagenzien benötigt. Die laut dieser Tabelle vorbereiteten Proben wurden auf dem „Thermomixer 5437®“ von Eppendorf® bei 37°C für 5min inkubiert, abzentrifugiert und im Thermocycler (PTC-200, MJ Research®) denaturiert. In Abhängigkeit der eingesetzten Sonden-DNA wurden zwei verschiedene Programme des Thermocyclers verwendet:

1. PREHYB:
   - Denaturierung: 75°C, 5min
   - Stabilisierung der Denaturierung: 4°C, 2min
   - Renaturierung & Abblocken repetitiver Sequenzen: 37°C, 30min

2. DIREKT:
   - Denaturierung: 72°C, 5min
   - Stabilisierung der Denaturierung: 4°C, bis zum Beenden des Programmes

Tab. 4.25: Zur Hybridisierung von $^{1}/_{3}$ bis ½ eines OT benötigte Reagenzien.

Verwendete Sonde	**Eingesetzte Reagenzien**	**Eingesetzte Volumina**	**Thermocycler-Programm**
3 BAC-Sonden	BAC-Sonden in mit 10ng Cot1-DNA präpariertem 0,5ml-Röhrchen	Je 2µl Sonden-DNA	PREHYB
2 BAC-Sonden	BAC-Sonden in mit 10ng Cot1-DNA präpariertem 0,5ml-Röhrchen	Je 2µl Sonden-DNA + 2µl DS	PREHYB
Kommerzielle Sonden (Cep/LSI)	ABBOTT®- Sonden und jeweiliger Spezial-Puffer	1µl Sonden-DNA + 3µl des Puffers	DIREKT
	Kreatech®- Sonden und jeweiliger Spezial-Puffer	2µl Sonden-DNA+ 2µl des Puffers	
MCB	MCB-Mix in mit 10ng Cot1-DNA präpariertem 0,5ml-Röhrchen	5µl MCB-Mix + 5µl DS	PREHYB
M-FISH	M-FISH-Mix in mit 25ng Cot1-DNA präpariertem 0,5ml-Röhrchen	5µl M-FISH-Mix + 5µ DS	PREHYB

Die denaturierten Sonden wurden anschließend auf den ebenfalls denaturierten OT gegeben, jeder Teilabschnitt des OT mit einem Deckglas (bei halbiertem OT 24mm x 24mm, bei gedritteltem OT 18mm x 24mm) bedeckt und mit Fixogum (Marabu®) luftblasenfrei versiegelt. Zur Hybridisierung wurden die OTs in eine angewärmte feuchte Kammer gegeben und über Nacht (bei Verwendung des M-FISH-Mixes für 3 Nächte) im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

4.7.2.4 Posthybridisierungs-Waschen und Detektion

Um die OTs von überschüssiger oder unspezifisch gebundener Sonden-DNA zu befreien, erfolgten anschließend an die Hybridisierung spezielle Wasch-Schritte. Auf diese Weise konnten störende Signale des Hintergrundes effektiv reduziert und ggf. vorhandene Haptene mit Antikörpern detektiert werden. Tabelle 4.26 gibt einen Überblick über die verwendeten Reagenzien.

Tab. 4.26: Zum Posthybridisierungs-Waschen und zur Detektion verwendete Reagenzien. Fortsetzung auf folgender Seite.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Hersteller**	**Erläuterung**
0,4xSSC	20xSSC	GibcoBRL®	10ml 20xSSC mit 490ml *Aqua dest.* versetzen, pH 7,0-7,5
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	
1xSSC	20xSSC	GibcoBRL®	25ml 1xSSC mit 475ml *Aqua dest.* versetzen, pH 7,0-7,5
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	
4xSSCTw	20xSSC	GibcoBRL®	100ml 20xSSC mit 400ml *Aqua dest.* versetzen und 250µl Tween 20 (Polyoxyethylensorbtian Monolaurat) darin lösen, pH 7,0-7,5
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	
	Tween 20 (0,05%)	Sigma-Aldrich®	

Bezeichnung	Bestandteile	Hersteller	Erläuterung
4xSSCTM	4xSSCTw	Siehe dort.	0,1g fettfreie Trockenmilch in 4xSSCTw lösen, bei 1500U/min abzentrifugieren, oberste Schicht verwerfen
	Fettfreie Trockenmilch	Marvel®	
20xSSC	20xSSC	GibcoBRL®	3,0M NaCl + 0,3M Natriumcitrat
1xPBS-Lösung	„phospate buffered saline“ (PBS)	Biochrom AG®	9,55g/l 47,75g PBS in 5l *Aqua dest.* lösen
	Aqua dest.	Seralpur DELTA Seral®	
Antikörper-Lösung	Streptavidin-FITC (Avidin-Fluorescein-5-iso-Thiocyanat)	Vector Laboratories®	Alle Antikörper wurden mit 4xSSCTM nach folgenden Verhältnissen versetzt. Zur Detektion Biotin-16-dUTP-markierter Sonden wurde Streptavidin-FITC (1:400) sowie SA-Cy5 (1:50) verwendet. Digoxigenin-11-dUTP-markierte Sonden wurden mit α-Dig-Rhod (1:10) detektiert.
	SA-Cy5 (FluoroLinkCy5-labelled-Streptavidin)	Amersham®	
	α-Dig-Rhod (anti-Digoxigenin-Rhodamin)	Roche®	
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	Sigma-Aldrich®	0,4%ige DAPI-Stocklösung (50µg/ml) mit Vectashield im Verhältnis 0,5:1000 bis 4:1000 versetzten und bei 4°C lagern
	Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories®	

Zunächst wurde eine Keramik-Küvette mit 1xSSC im Wasserbad auf 65°C temperiert. Die OTs wurden mit einer Pinzette von Deckgläsern und Fixogum-Rückständen befreit und anschließend für 5min in der vorbereiteten Küvette gewaschen. Wurden Zentromer-Sonden verwendet, erfolgte das Waschen in einer mit 0,4xSSC gefüllten und auf 65-70°C temperierten Küvette für 2min. Die OTs wurden nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit in eine lichtundurchlässige mit 4xSSCTw gefüllte Küvette überführt und für 5min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (Vibramax 100, Heidolph Instruments®) gewaschen. Wurden nur direkt markierte Sonden verwendet, erforderte dies keine Detektion durch Antikörper. Die OTs wurden dann ein zweites Mal für 5min in 4xSSCTw bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen und anschließend in 1xPBS-Lösung, ebenfalls auf dem Schüttler und bei Raumtemperatur, für 1min gespült. Schließlich wurden die OTs mittels aufsteigender Ethanol-Reihe dehydriert und unter Lichtschutz luftgetrocknet. Die Gegenfärbung erfolgte mit 20µl DAPI.

Bei Verwendung indirekt markierte Sonden galt es die Waschung durch Detektions-Schritte zu modifizieren. Hierbei wurden die OTs nach dem o.g. ersten 4xSSCTw-Waschschritt mit je 100µl SSCTM und einem Deckglas (24mm x 60mm) bedeckt und für 15min in einer feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Diese Behandlung dient dem Abdecken unspezifischer Bindungsstellen, welche mit den später verwendeten Antikörper interagieren könnten. Nach Ablauf

der Inkubationszeit wurden die Deckgläser von den OTs entfernt und diese auf dem Schüttler für 1min bei Raumtemperatur in 4xSSCTw gewaschen. Zur Detektion der Hapten-markierten BACs wurde die vorbereitete Antikörper-Lösung aufgetropft, die OTs mit Deckgläsern (24mm x 60mm) abgedeckt und für 45min bei 37°C in einer feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert. Die Deckgläser wurden nach der Inkubation erneut entfernt und die OTs je zweimal in 4xSSCTw und 1xPBS-Lösung für je 5min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen. Dies entfernte überschüssige Antikörperrückstände. Abschließend erfolgte das Spülen der OTs mit *Aqua dest.* und die Dehydrierung mittels aufsteigender Ethanol-Reihe (70%, 95%, $EtOH_{abs}$ für je 3min, siehe Tab.4.10). Die OTs wurden unter lichtgeschützten Bedingungen luftgetrocknet, mit 20µl DAPI gefärbt und bei 4°C gelagert.

4.7.3 Aufzeichnung und Bearbeitung der Präparate

Die hybridisierten und ggf. Antikörper-detektierten OTs wurden an einem Fluoreszenzmikroskop des Typs Axioplan 2 (Zeiss®) mit einem 5-Farben Filtersystem unter Zuhilfenahme einer CCD-Kamera (IMAC®) aufgenommen. Dabei wurden ein 100x Objektiv und Immersionsöl (Immersol™ 518 F, Zeiss®) verwendet. Tabelle 4.27 gibt einen Überblick über die Fluorochrome und die zur Aufnahme benötigten Filter. Die fotografierten Metaphasen wurden mittels ISIS-Software (MetaSystems®) bearbeitet und ausgewertet. Ergebnisse der Hybridisierung von MCB- oder M-FISH-Mixen erforderten dabei die Verwendung bereits etablierter Falschfarbdateien.

Tab. 4.27: Verwendete Fluorochrome und dazugehörige Filter.

Fluorochrom	**Absorptions-maximum (nm)**	**Emissions-maximum (nm)**	**Filter**	**Farbe**
DAPI	359	461	DAPI	blau
DEAC	426	480	DEAC	hellblau
SG	497	524	SG	grün
Streptavidin-FITC	494	524	SG	grün
SO	559	588	Cy3	orange
TR	595	615	Cy3.5	rot
α-Dig-Rhod	595	615	Cy3.5	rot
SA-Cy5	649	670	Cy5	gelb

4.8 Methodik der Ergebnisbeurteilung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der ISCN (Shaffer und Tommerup 2005). Im folgenden Abschnitt soll kurz die zur Ergebnisbeurteilung genutzte Terminologie dargelegt werden.

4.8.1 Zytogenetische Beurteilung

Zur zytogenetischen Beurteilung der Metaphasen wurden folgende Begriffe verwendet:

- Chromosomenbanden: In der GTG- oder invertierten DAPI-Färbung hell (Euchromatin) bzw. dunkel (Heterochromatin) erscheinende chromosomale Abschnitte.
- Chromosomenbruch/Isochromatidbruch (chrb): Diskontinuität in der gleichen Bande beider Chromatide eines Chromosoms sowie vollständige Dislokation der Bruchstücke.
- Chromatidbruch (chtb): Diskontinuität eines Chromatids eines Chromosoms sowie Dislokation der Bruchstücke.
- Chromatid-Gap: Diskontinuität eines Chromatids ohne erkennbare Dislokation.
- Reunionsfigur (rb): Rearrangements zwischen mehreren Chromosomen auf Grund der Fusion an mindestens je einem Chromatidbruch der beteiligten Chromosomen. In Abhängigkeit der Anzahl der freien Enden der Figur als di-, tri-, quadri- oder multiradial bezeichnet (Oostra *et al.* 2012).
- Satellitenassoziation (sa): Assoziation zweier akrozentrischer Chromosomen im Bereich ihrer Satelliten.

Die Bruchereignisse wurden wie folgt gezählt. Chromatidbrüche wurden in Anlehnung an Schoder als ein und Chromosomenbrüche als zwei Bruchereignisse bewertet (Schoder 2009). Jeder einzelne Chromatidbruch, welcher an der Bildung von Reunionsfiguren (rb) beteiligt war, wurde ebenfalls als ein Bruchereignis gezählt. Waren akrozentrische Chromosomen über ihre Satelliten an rb beteiligt, wurde dies als ein mögliches Bruchereignis innerhalb dieser Region verzeichnet. Aberrationen, welche den Karyotyp von 100% der Zellen der nativen Suspensionen bestimmten (siehe Abschnitt 5.2.1.1), wurden vernachlässigt. Satellitenassoziationen und Chromatid-Gaps wurden nach Empfehlung von Oostra *et al.* nicht als Bruchereignis gezählt (Oostra *et al.* 2012). Die Abbildung 4.3 gibt einen Überblick über die differenzierbaren zytogenetischen Auffälligkeiten und unter 4.4 sind Beispiele verschiedener Reunionsfiguren zu sehen.

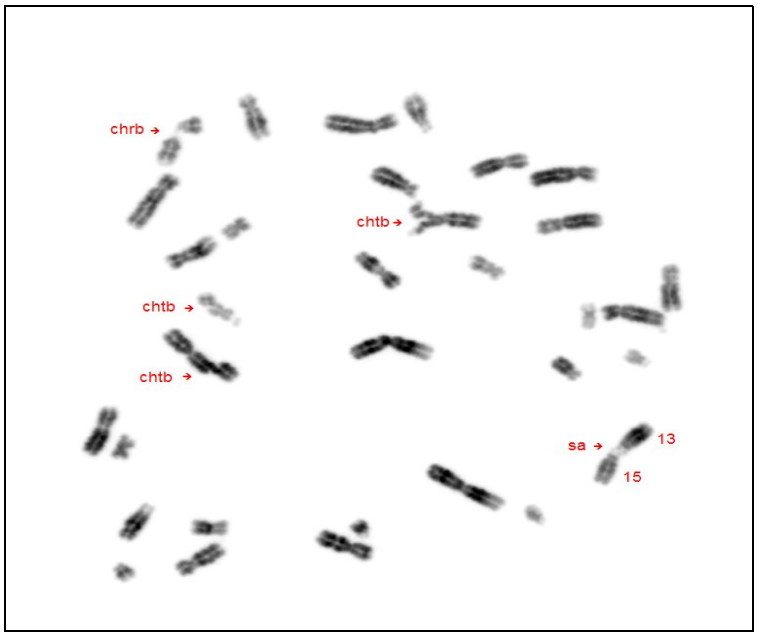


Abb. 4.3: Übersicht der differenzierbaren zytogenetischen Auffälligkeiten. Bezeichnungen: chrb: Chromosomenbruch, chtb: Chromatidbruch, sa: Satellitenassoziation.

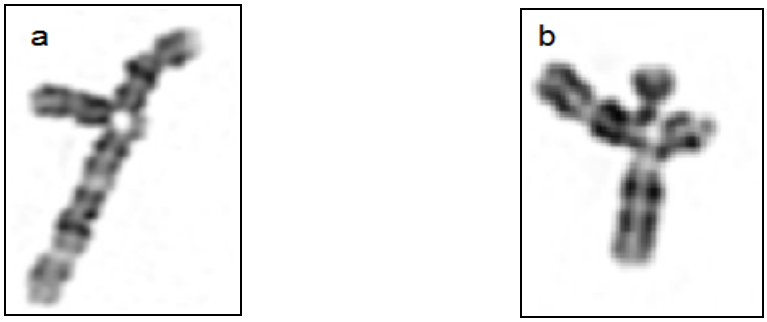


Abb. 4.4: a: Beispiel einer Triradialfigur, b: Beispiel einer Quadriradialfigur.

4.8.2 Molekular-zytogenetische Beurteilung

Die Abbildung 4.5 verdeutlicht das Prinzip der Auswertung der Hybridisierungen. Zur Beurteilung der Hybridisierungen wurden folgende Begriffe genutzt:

- Proximal: ein BAC galt als proximal des Bp, wenn er p-terminal des Bp lag.
- Distale Grenze: ein BAC, welcher an der Richtung p-terminal liegenden Grenze des Bp hybridisierte.
- Innerhalb: ein BAC, welcher innerhalb des Bruchpunkts lag.
- Distale Grenze: ein BAC, welcher an der Richtung q-terminal liegenden Grenze des Bp hybridisierte.
- Distal: ein BAC, welcher q-terminal des Bp lag.

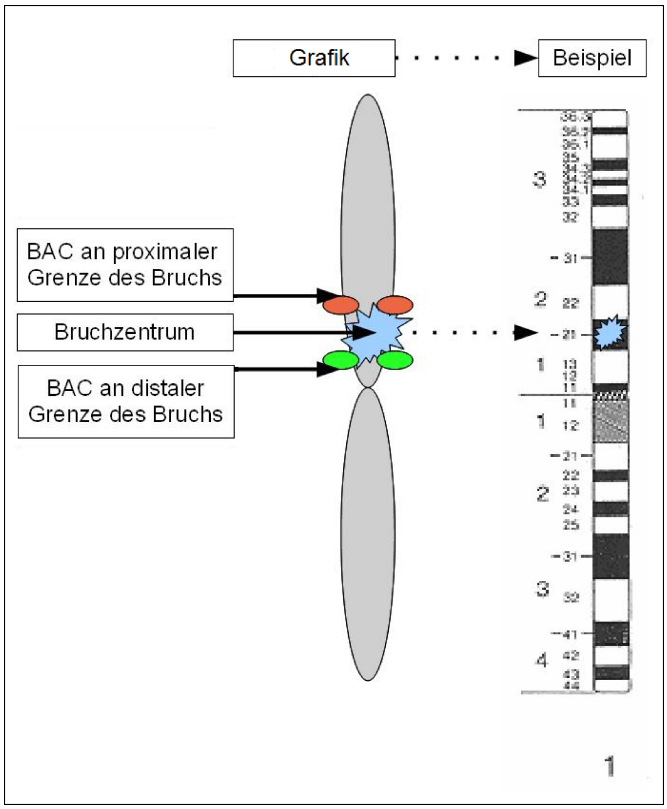


Abb.4.5: Grafik zur Auswertung der Lage der BACs im Bezug zum bearbeiteten Bruchpunkt.

4.8.3 Datenbanken

Innerhalb dieser Arbeit wurden folgende Datenbanken zur Beurteilung der Bruchpunkt verwendet:

- http://margalit.huji.ac.il/cgi-margalit/TwistFlex/TwistFlex.cgi
- www.atlasgeneticsoncology.org
- www.bacpac.chori.org/
- www.cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman
- www.genecards.org
- www.genome.ucsc.edu
- www.ncbi.nlm.nih.gov/books
- www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview
- www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
- www.projects.tcag.ca/variation
- www.repeatmasker.org
- www.rockefeller.edu/fanconi/
- www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/chromosome.shtml
- www.waldman.ucsf.edu/GENES/completechroms.html
- www.wikipedia.org.

5 Ergebnisse

5.1 Statistische Bewertung der zytogenetischen Ergebnisse

Die statistische Erhebung erfolgte an Material von sechs Probanden, darunter vier FA-Patienten sowie zwei gesunde Kontrollpersonen (Ko, siehe Kapitel 4.1). Es wurden 1854 Metaphaseplatten (MPP) hinsichtlich chromosomaler Brüche untersucht. Dabei wurden invertierte DAPI-gefärbte Chromosomen im Bandenstadium zwischen 350 und 550 Banden bearbeitet. Die Auswertung erfolgte auf zytogenetischer Ebene mit Hilfe der unter Abschnitt 4.8 erläuterten Terminologie. Insgesamt wurden 5130 Bruchereignisse, 146 Satellitenassoziationen und 595 chromosomale Figuren beobachtet. Die Daten wurden nach dem in Tabelle 5.1 beschriebenen Design erhoben.

Tab.5.1: Übersicht zur statistischen Erhebung am Beispiel einer Kontrollperson sowie eines FA-Patienten.

Suspension	**Kontrollperson 1**	**FA-Patient 1**
Ohne Zusatz reaktiven Agens	100 MPP (Ko_{1A})	100 MPP (FA_{1A})
Zusatz von 50ng/ml Mitomycin C (MMC)	100 MPP (Ko_{1B})	100 MPP (FA_{1B})
Zusatz von 0,2µnol/l Aphidicolin (Aph)	100 MPP (Ko_{1C})	100 MPP (FA_{1C})

Eine Ausnahme von diesem Design ist FA-Patient 4. Es wurden 154 Metaphasen der MMC-behandelten Suspension (FA_{IVB}) dieses Probanden ausgewertet.

5.1.1 Bruchraten

Die mittleren Bruchraten wurden als Quotient der Anzahl der Bruchereignisse und der Anzahl der bewerteten Metaphasen der jeweiligen Suspension errechnet.

5.1.1.1 Rate spontaner Bruchereignisse

Die spontanen Bruchraten der jeweiligen Probanden wurden aus den Daten der nativen Suspensionen (Index A) ermittelt (Tab. 5.2).

Tab. 5.2: Überblick der spontanen Bruchraten sowie deren Mittelwerte.

Suspension	**Kontrollpersonen**		**FA-Patienten**			
	Ko_{1A}	Ko_{2A}	FA_{1A}	FA_{2A}	FA_{3A}	FA_{4A}
Spontane Bruchrate	0,02	0,02	0,04	0,17	0,16	0,06
Mittelwert	0,02		≈ 0,11			

Das Material von FA-Patienten wies eine mittlere spontane Bruchrate von rund 0,11 Brüchen pro Metaphase auf. In 11% der Metaphasen der FA-Patienten konnte also ein spontaner Chromatidbruch beobachtet werden. Für die Kontrollpersonen errechnete sich eine gemittelte spontane Bruchrate von 0,02 Brüchen pro Metaphase. Dementsprechend trat bei den Kontrollpersonen nur in 2% der Metaphasen ein Chromatidbruch auf. Die zugehörige Signifikanzbewertung findet sich im Abschnitt 6.3.1.1.1 des Kapitels „Diskussion“.

5.1.1.2 Rate der Bruchereignisse nach MMC-Inkubation

Die errechneten Bruchraten des MMC-behandelten Materials (Index B) können Tabelle 5.3 entnommen werden.

Tab 5.3: Bruchraten MMC-behandelter Suspensionen sowie deren Mittelwerte. Anmerkung: Die Bruchrate des FA-Patienten 4 wurde auf den Wert von 100 ausgewerteten MPP normiert.

Suspension	**Kontrollpersonen**		**FA-Patienten**			
	Ko_{1B}	Ko_{2B}	FA_{1B}	FA_{2B}	FA_{3B}	FA_{4B}
Bruchrate	0,57	0,58	8,68	7,46	15,34	6,72
Mittelwert	≈0,58		≈9,55			

Im MMC-behandelten Material von FA-Patienten traten rund 10 Chromatidbrüche je Metaphase auf. Die MMC-behandelten Suspensionen der Kontrollpersonen hingegen wiesen im Mittel etwa in jeder zweiten Metaphase ein Bruchereignis auf. Der Anteil der Metaphasen in Abhängigkeit der Bruchanzahl pro Metaphase kann der Abbildung 5.1 entnommen werden.

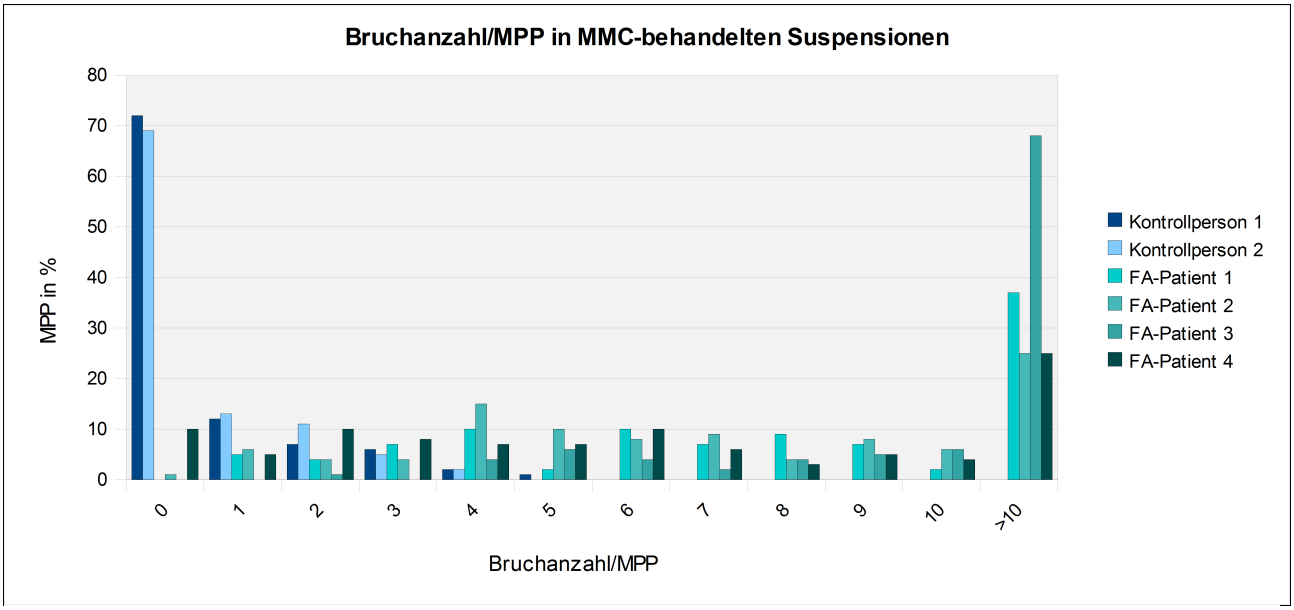


Abb. 5.1: Anteil der MPP MMC-behandelter Suspensionen in % in Abhängigkeit der Bruchanzahl pro MPP.

Die der Abb. 5.1 entnehmbare Verteilung der Bruchereignisse zeigt, dass in etwa 70% der MPP der MMC-behandelten Suspensionen der Kontrollpersonen kein Chromatidbruch beobachtet werden konnte. Rund 12% der MPP wiesen einen und rund 9% der MPP zwei Chromatidbrüche auf. Die übrigen 9% der MPP der Kontrollpersonen beinhalteten mehrere Bruchereignisse (maximal fünf).
Das MMC-behandelte Material der FA-Patienten zeigte etwa in 2% der MPP kein Bruchereignis. Ein Chromatidbruch trat in etwa 4%, zwei bzw. drei Chromatidbrüche jeweils in etwa 5% auf. Rund 84% der MPP wiesen vier und mehr Brüche auf. Darin enthalten ist auch der Anteil der MPP, welche zehn und mehr Brüche beinhalteten. Dieser betrug im Mittel 39%. Hierbei konnten jedoch deutliche interindividuelle Schwankungen beobachtet werden. So waren zehn und mehr Bruchereignisse bei FA-Patient 1 in 37% der MPP, bei den FA-Patienten 2 und 4 in 25% der MPP, bei FA-Patient 3 jedoch in 68% der MPP zu verzeichnen. Die Tabelle 8.1 des Anhangs gibt die in Abb. 5.1 grafisch dargestellten Daten und deren Mittelwerte wieder. Die Beurteilung der Signifikanz dieser Daten ist unter Abschnitt 6.3.1.1.2 des Kapitels „Diskussion“ zu finden.

5.1.1.3 Rate der Bruchereignisse nach Aphidicolin-Inkubation

Die errechneten Bruchraten der Aphidicolin-behandelten Suspensionen (Index C) können der Tabelle 5.4 entnommen werden.

Tab. 5.4: Bruchraten Aph-behandelter Suspensionen sowie deren Mittelwerte. Anmerkung: Aufgrund des stark abweichenden Ergebnisses des FA-Patienten 3 wurde dieses bei der Mittelwert-Berechnung für FA-Patienten nicht mit einbezogen.

Suspension	**Kontrollpersonen**		**FA-Patienten**			
	Ko_{1C}	Ko_{2C}	FA_{1C}	FA_{2C}	FA_{3C}	FA_{4C}
Bruchrate	2,21	2,06	0,09	0,25	(3,01)	0,13
Mittelwert	≈2,14		≈0,16			

Das Aph-behandelte Material der Kontrollpersonen wies rund 2 Bruchereignisse pro Metaphase auf. Der Mittelwert der Bruchraten der FA-Patienten 1, 2 und 4 beträgt rund 0,16 Brüche pro Metaphase. Innerhalb der Suspensionen dieser drei Probanden trat also nur in 16% der Metaphasen ein Bruch auf. Die Ergebnisse des FA-Patienten 3 wurden aufgrund der deutlichen Abweichung zu den Ergebnissen der anderen FA-Patienten nicht in die Mittelwert-Berechnung mit einbezogen. Die Anzahl der Metaphasen in Abhängigkeit der Bruchanzahl pro Metaphase können der Abbildung 5.2 entnommen werden. Die in dieser Abbildung grafisch dargestellten Daten und deren Mittelwerte finden sich als Tabelle 8.2 im Anhang.

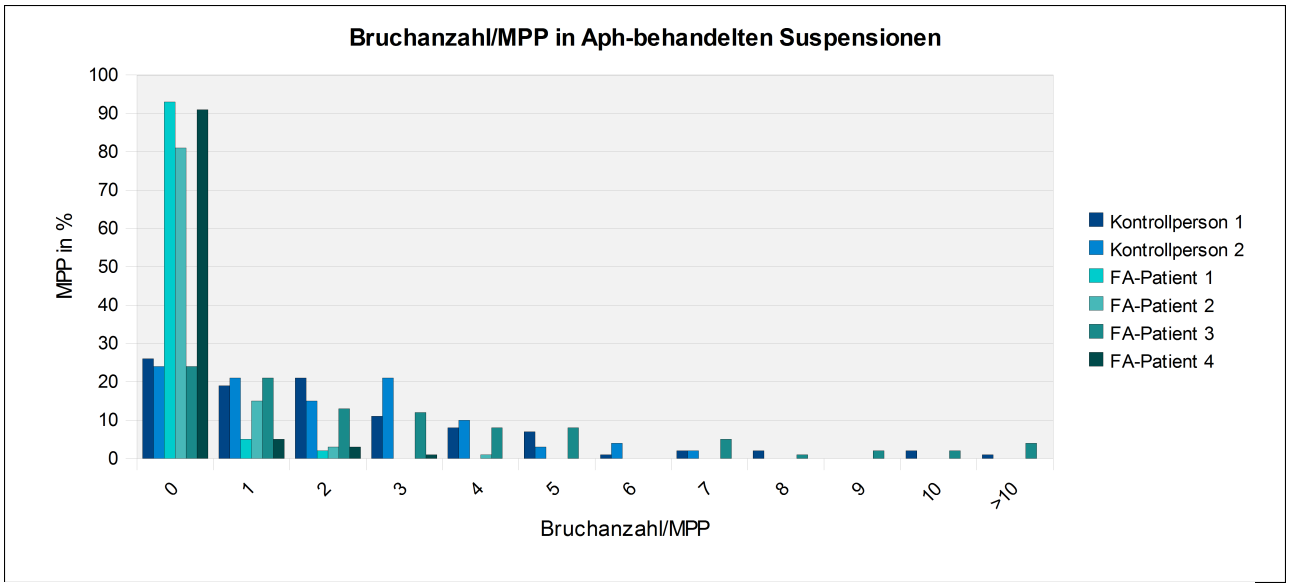


Abb. 5.2: Anteil der MPP Aph-behandelter Suspensionen in % in Abhängigkeit der Bruchanzahl pro MPP.

Die Abb. 5.2 gibt die Verteilung der Bruchereignisse innerhalb der Aph-behandelten Suspensionen wieder. Das Material der Kontrollpersonen wies in rund 25% der MPP keinen Chromatidbruch auf. Ein Bruchereignis wurde in 20% der MPP und zwei Bruchereignisse im Mittel in 18% der Aph-behandelten MPP der Kontrollpersonen beobachtet. In 37% der MPP waren drei und mehr Chromatidbrüche zu verzeichnen. In den Aph-behandelten Suspensionen der FA-Patienten 1, 2 und 4 waren in rund 88% der MPP keine Bruchereignisse zu beobachten. Ein Bruchereignis trat in rund 8% und zwei Bruchereignisse in rund 3% der MPP auf. Die von FA-Patient 3 erhobenen Daten wichen stark von den Ergebnissen der übrigen Patienten ab und werden daher gesondert beurteilt. Das Aph-behandelte Material dieses Probanden wies in 24% der MPP kein Bruchereignis, in 21 % ein Bruchereignis, in 13% zwei Bruchereignisse und in 42% der MPP drei und mehr Bruchereignisse auf. Die Verteilung der Chromatidbrüche innerhalb des Materials des FA-Patienten 3 ähnelte daher eher der Bruchverteilung einer Kontrollperson. Die Beurteilung der Signifikanz kann dem Abschnitt 6.3.1.1.3 des Kapitels Diskussion entnommen werden.

5.1.2 Zytogenetische Charakterisierung chromosomaler Bruchereignisse

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 5130 Bruchereignisse auf zytogenetischer Ebene bewertet. Einen Überblick hierzu gibt Tabelle 8.3 des Anhangs. 1265 (24,66%) der ermittelten Chromatidbrüche waren an der Ausbildung von Reunionsfiguren (rb) beteiligt. Die übrigen 75,34% waren freie Brüche ohne Verbindung zu weiteren Chromosomen.

In 97,15% der Fälle wurden Chromatidbrüche beobachtet. Lediglich in 2,85% aller Bruchereignisse lag ein Chromosomenbruch vor (siehe auch Kapitel 4.8.1 sowie Abb. 4.3).

5.1.2.1 Chromosomenbrüche (chrb)

Bruchereignisse in der gleichen Bande beider Chromatide, welche zur vollständig Trennung der Chromosomenbruchstücke führten, wurden als Chromosomenbruch bewertet. Im folgenden Abschnitt werden sie als eigenständige Form von Bruchereignissen hinsichtlich ihrer Häufigkeit und zytogenetischen Lokalisation beurteilt.

5.1.2.1.1 Häufigkeit der Chromosomenbrüche

Insgesamt waren 73 Chromosomenbrüche zu verzeichnen. Sie werden in Tabelle 8.4 des Anhangs in Übersicht dargestellt. Abbildung 5.3 stellt die Häufigkeit der Chromosomenbrüche innerhalb der verschiedenen Suspensionen dar.

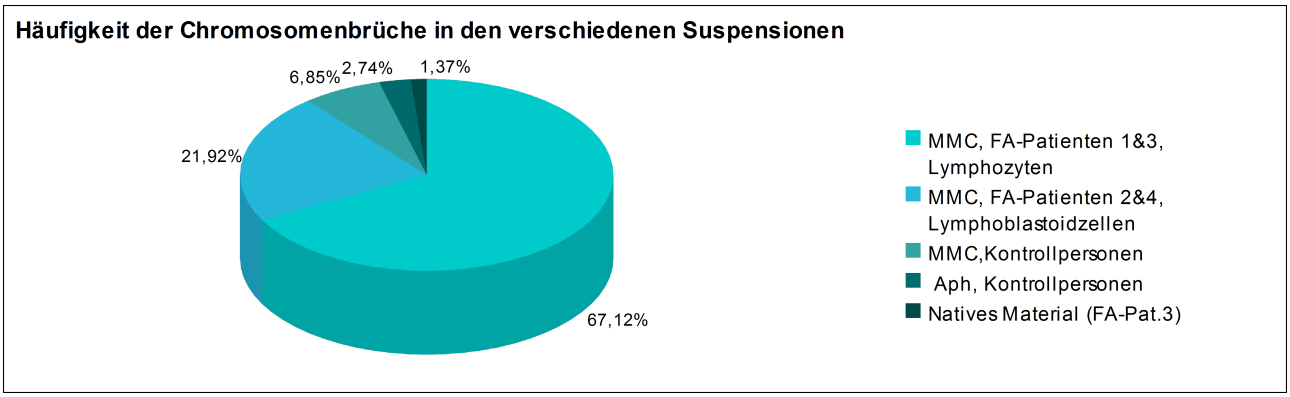


Abb. 5.3: Grafik zur Häufigkeit der Chromosomenbrüche innerhalb der verschiedenen Suspensionen.

Spontane Chromosomenbrüche traten nur im nativen FA-Material auf (1,37% aller chrb). Aph-induzierte Chromosomenbrüche konnten hingegen nur in Suspensionen der Kontrollpersonen beobachtet werden (2,74% aller chrb). Nach MMC-Inkubation waren sowohl Suspensionen der Kontrollpersonen (ca. 6,85% aller chrb) als auch der FA-Patienten (89,04% aller chrb) von Chromosomenbrüchen betroffen. Abb. 5.3 zeigt zudem, dass die Mehrheit der Chromosomenbrüche in FA-Lymphozyten-Suspensionen (FA-Patienten 1 und 3) und nicht in Suspensionen der FA-Lymphoblastoid-Zelllinien (FA-Patienten 2 und 4) auftrat.

5.1.2.1.2 Lokalisation der Chromosomenbrüche

Die Chromosomen 1 (32,88%), 2 (12,33%), 5 (8,22%) und 11 (8,22%) wiesen am häufigsten Chromosomenbrüche auf, während in den Chromosomen 13, 16, 18, 19, 20 und 21 keine derartigen Ereignisse zu beobachten waren. Eine Übersicht zu den beobachteten Chromosomenbrüchen ist in Tabelle 8.2 des Anhangs zu finden. Von 73 Chromosomenbrüchen traten 16 (21,91%) innerhalb der Zentromere auf. Weitere 11 Chromosomenbrüche (15,28%) waren in den zentromernahen Banden zu verzeichnen. Die übrigen Brüche waren eher zufällig verteilt. Innerhalb der telomernahen Banden traten jedoch keine Chromosomenbrüche auf.

5.1.2.2 Chromatidbrüche (chtb)

Bruchereignisse innerhalb einer chromosomalen Bande, welche zur Dislokation aber nicht zu vollständigen Trennung der Bruchstücke führten, wurden als Chromatidbrüche bewertet. Da aber auch Chromosomenbrüche als Äquivalent zweier Chromatidbrüche innerhalb einer Bande betrachtet werden können, wurden die zytogenetischen Daten dieser Bruchereignisse in den folgenden Ausführungen zur Lokalisation von Chromatidbrüchen berücksichtigt.

5.1.2.2.1 Lokalisation der Chromatidbrüche des MMC-behandelten FA-Materials

Im MMC-behandelten FA-Material waren 4184 Chromatidbrüche in 356 unterschiedlichen Banden zu verzeichnen. 17,67% der Brüche traten in telomernahen Banden, 6,91% in zentromernahen Banden und 0,55% im Satellitenbereich auf. Die übrigen 74,87% der Chromatidbrüche waren über die Länge der Chromosomen-Arme verteilt. Die Abbildung 5.4 gibt die Häufigkeit der Bruchereignisse in hellen bzw. dunklen Banden wieder.

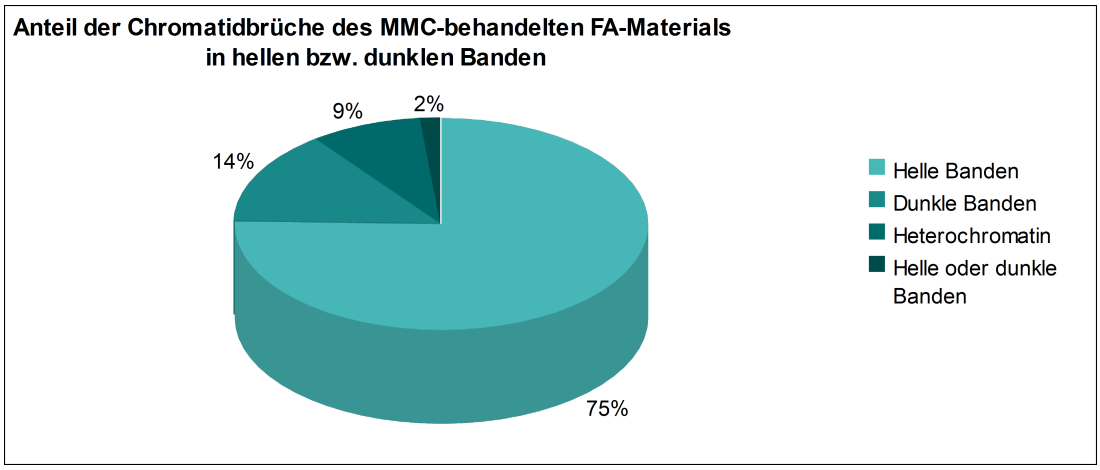


Abb. 5.4: Anteile der Chromatidbrüche im MMC-behandelten FA-Material in hellen bzw. dunklen Banden.

75% der Chromatidbrüche traten in hellen (euchromatischen) und 14% in dunklen Banden auf. Weitere 9% konnten im Heterochromatinbereich der Zentromere oder der subzentromeren Banden der Chromosomen 1, 3, 9, 16 und 19 sowie der akrozentrischen Chromosomen beobachtet werden. Die übrigen 2% der Bruchereignisse lagen im Grenzbereich zwischen hellen und dunklen Banden und waren daher nicht zweifelsfrei einem bestimmten chromatischen Bereich zuzuordnen. Tabelle 5.5 gibt eine Übersicht über die sechs am häufigsten von Bruchereignissen betroffenen Banden der einzelnen MMC-behandelten FA-Suspensionen.

Tab. 5.5: Übersicht der häufigsten Bp innerhalb des MMC-behandelten Materials eines jeden FA-Patienten unter Angabe der Gesamtbruchanzahl sowie der Expressionshäufigkeit der Bp.

Rang der Häufigkeit des Bp	**Suspension FA_{1B}** n = 868		**Suspension FA_{2B}** n = 746		**Suspension FA_{3B}** n = 1534		**Suspension FA_{4B}** n = 1036	
	Bande	Anteil	Bande	Anteil	Bande	Anteil	Bande	Anteil
1	9q13	1,73%	3p21	2,01%	1q21	1,43%	1q21	1,83%
2	1p36.3	1,61%	1q21	1,74%	4q31	1,37%	3p21	1,74%
3	1p32	1,50%	3q21	1,61%	7q11.23	1,11%	11q13	1,54%
4	1q21	1,38%	7q11.23	1,61%	3p21	1,04%	5q31	1,45%
5	3p21	1,38%	15q22	1,61%	1p36.3	0,98%	17q25	1,25%
6	11p11.2	1,27%	Xq22	1,61%	2q21	0,98%	1p36.1	1,16%

Tabelle 5.5 zeigt, dass unter den sechs am häufigsten von Bruchereignissen betroffenen Banden die Banden 1q21 und 3p21 bei allen vier FA-Patienten vertreten sind. Nur die Bp 7q11.23 und 1p36.3 waren ebenfalls mehrfach (zwei FA-Betroffene) unter den sechs häufigsten Bp zu verzeichnen.

5.1.2.2.2 Lokalisation der Chromatidbrüche des Aph-behandelten Materials der Kontrollpersonen

Innerhalb dieses Materials wurden 435 Chromatidbrüche in 122 unterschiedlichen Banden beobachtet. 16,78% der Brüche traten in telomernahen Banden und 4,14% der Brüche innerhalb zentromernaher Banden auf. Satelliten waren nicht von Bruchereignissen betroffen. Die Abbildung 5.5 verdeutlicht die Häufigkeit der Bruchereignisse in hellen bzw. dunklen Banden.

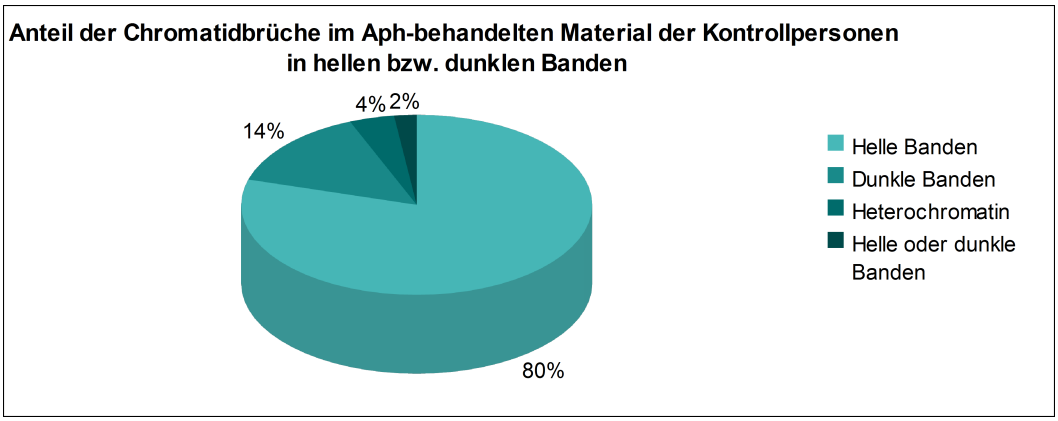


Abb. 5.5: Anteile der Chromatidbrüche im Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen in hellen bzw. dunklen Banden.

80% der Bruchereignisse des Aph-behandelten Materials der Kontrollpersonen traten in hellen Banden und 14% in dunklen Banden auf. Lediglich 4 % der Brüche waren im Heterochromatin der zentromernahen Bereiche zu beobachten. Die übrigen 2% waren nicht eindeutig einer hellen bzw. dunklen Bande zuzuordnen. Die Tabelle 5.6 zeigt die sechs am häufigsten von Bruchereignissen betroffenen Banden des Aph-behandelten Materials der Kontrollpersonen.

Tab. 5.6: Übersicht der häufigsten Bp innerhalb des Aph-behandelten Materials der beiden Kontrollpersonen unter Angabe der Gesamtbruchanzahl sowie der Expressionshäufigkeit der einzelnen Bp.

Rang der Häufigkeit des Bruchpunktes	**Suspension Ko_{1C}** n = 228		**Suspension Ko_{2C}** n = 207	
	Bande	Anteil	Bande	Anteil
1	3p14	11,40%	3p14	19,81%
2	16q23	7,89%	16q23	15,46%
3	Xp22	7,89%	Xp22	5,80%
4	6q26	4,39%	6q26	4,83%
5	Xq22	4,39%	1p11/1q11	2,41%
6	7q32	2,63%	7q32	1,93%

Tabelle 5.6 zeigt, dass die sechs häufigsten Bp innerhalb der beiden Aph-behandelten Suspensionen der Kontrollpersonen weitgehend identisch waren. Lediglich der Bp Xq22 war in Suspension Ko_{2C} nicht so häufig vertreten, wie in Suspension Ko_{1C}. Zudem fielen interindividuelle Schwankungen der Häufigkeit der Bp auf (siehe hierzu auch 5.1.2.3.3).

5.1.2.3 Vergleich der Bruchereignisse des Aph- und MMC-behandelten Materials

Im folgenden Abschnitt werden Bruchereignisse der MMC-behandelten Suspensionen der FA-Patienten mit denen der Aph-behandelten Suspensionen der Kontrollpersonen verglichen.

5.1.2.3.1 Anzahl der differenzierbaren Bruchpunkte in Aph- und MMC-behandelten Material

Um eine präzise Beurteilung der Anzahl der differenzierbaren Bp eines jeden Chromosoms zu ermöglichen, mussten sowohl die methodische Auflösungsgrenze als auch die variablen Bandenstadien der beurteilten MPP berücksichtigt werden. Somit wurden Bruchereignisse, welche Auflösungsbedingt den bisher nicht als FS beschriebenen Grenzbereichen zweier Banden zugeordnet wurden, vernachlässigt. Zudem galt es die doppelte Verrechnung bestimmter Regionen zu vermeiden. In Abhängigkeit des Bandenstadiums waren einige Bruchereignisse in Subbanden bestimmter chromosomaler Regionen zu verzeichnen. War dies der Fall, wurde die jeweilige übergeordnete Bande vernachlässigt. Unter Berücksichtigung der o.g. Ausnahmen traten im MMC-behandelten FA-Material 356 und im Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen 120 eindeutig differenzierbare Bruchpunkte auf. Die Tabelle 5.7 gibt einen Überblick über den durchschnittlichen Abstand zwischen den Bruchpunkten des MMC-behandelten Materials der FA-Patienten sowie des Aph-behandelten Materials der Kontrollpersonen. Zur Berechnung wurde die Größe des jeweiligen Chromosoms (in Mbp) zur jeweils errechneten Bruchpunktanzahl ins Verhältnis gesetzt.

Tab. 5.7: Anzahl der Bruchpunkte sowie durchschnittlicher Abstand zwischen den Bruchpunkten des MMC-behandelten FA-Materials sowie des Aph-behandelten Materials der Kontrollpersonen in Mbp.

Chromosom		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
MMC	Bruchpunkte	23	25	23	22	21	20	19	17	17	15	18	15
	Abstand in Mbp	10,84	9,73	8,61	8,69	8,62	8,56	8,38	8,61	8,31	9,04	7,50	8,92
Aph	Bruchpunkte	11	12	7	4	8	12	8	7	6	5	8	2
	Abstand in Mbp	22,66	20,27	28,29	47,79	22,62	14,26	19,89	20,9	23,54	27,11	16,88	66,92
Chromosom		**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**X**	
MMC	Bruchpunkte	10	13	12	14	12	9	10	10	5	6	20	
	Abstand in Mbp	11,52	8,26	8,54	6,45	6,77	8,68	5,91	6,30	9,63	8,55	7,76	
Aph	Bruchpunkte	5	4	0	3	3	5	0	2	1	2	5	
	Abstand in Mbp	23,03	26,84	-	30,12	27,07	15,62	-	31,52	48,13	25,65	31,05	

Tabelle 5.7 zeigt, dass der mittlere Abstand zwischen den differenzierbaren Bruchpunkten der einzelnen Chromosomen im MMC-behandelten Material der FA-Patienten geringer als im Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen ist. Das Material der FA-Patienten weist somit nicht nur eine gesteigerte Expression einiger bestimmter Bruchpunkte sondern auch eine erhöhte Anzahl von zu Brüchen neigenden Regionen auf. Die Abbildungen 5.4 und 5.5 verdeutlichen, dass sich die Bruchereignisse der beiden Versuchsreihen hinsichtlich der chromatischen Eigenschaften der betroffenen Banden kaum unterscheiden. Im Material der FA-Patienten traten 75% der Brüche in hellen Banden und 14% in dunklen Banden auf. In den Aph-behandelten Suspensionen der Kontrollpersonen waren 80% der Brüche innerhalb heller und 14% der Brüche innerhalb dunkler Banden zu verzeichnen. Dementsprechend scheinen die hellen Banden der Chromosomen beider Versuchsreihen fragiler als die dunklen Banden zu sein.

5.1.2.3.2 Kolokalisation FA-assoziierter Bruchereignisse zu FSs

Die Beurteilung der FA-assoziierten Chromatidbrüche bezüglich ihrer zytogenetischen Kolokalisation zu FSs sowie der Bruchereignisse des Aph-behandelten Materials der Kontrollpersonen erfolgte unter Verwendung der von Mrasek *et al.* 2010 empfohlenen Klassifikation (Mrasek *et al.* 2010). Dementsprechend wurde innerhalb der folgenden Auswertung auf eine Unterscheidung von RFSs und CFSs verzichtet. Die ermittelten Bruchpunkte der MMC-behandelten FA-Suspensionen konnten drei Kategorien zugeordnet werden. Hierbei wurden Bruchpunkte, welche mit FSs kolokalisierten, von Bruchpunkten, welche nicht mit FSs kolokalsierten, unterschieden. Die dritte Kategorie beinhaltete Bruchereignisse, welche innerhalb einer Bande niedrigeren Bandenstadiums beobachtet wurden und so potentiell mit FSs bestimmter

Subbanden kolokalisieren. Ein Beispiel hierfür seien FA-assoziierte Bruchereignisse der Bande 1q25, welche potentiell FRA1G in 1q25.1 entsprechen. Von 4184 Bruchereignissen in MMC-behandeltem FA-Material kolokalisierten 2601 Brüche (62,17%) mit FSs. 886 Bruchereignisse (21,17%) wiesen eine potentielle Kolokalisation auf und 697 (16,66%) traten in Banden auf, welche nicht als FSs beschrieben sind. Die Abbildung 5.6 gibt einen Überblick über die zytogenetische Kolokalisation der FA-assoziierten Bruchereignisse der einzelnen Probanden.

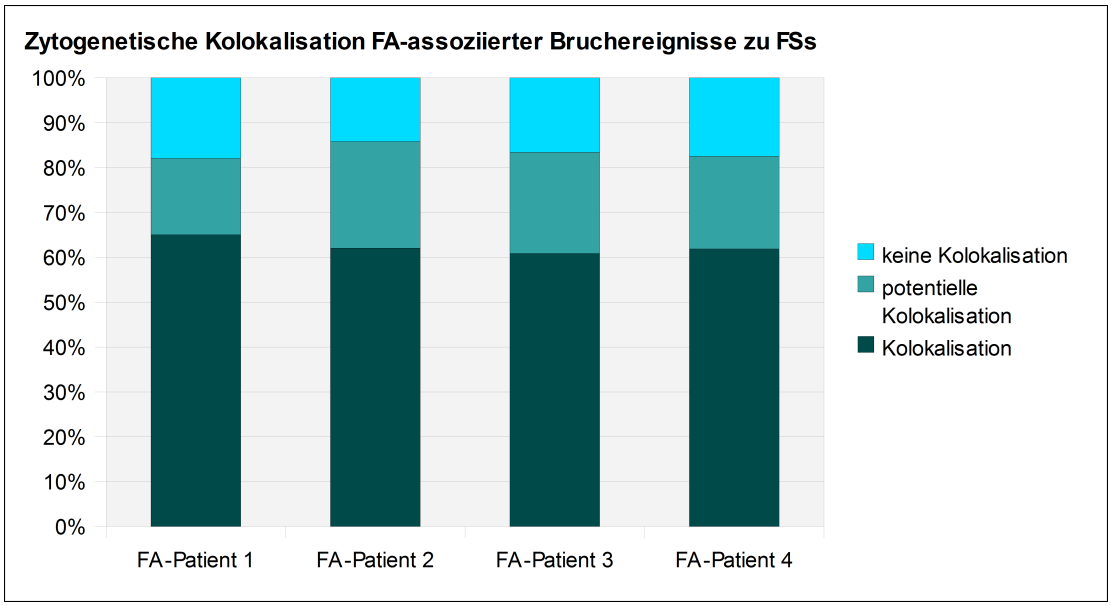


Abb.5.6: Zytogenetische Kolokalisation der Bruchereignisse des MMC-behandeltem FA-Materials zu FSs.

Die Abbildung 5.6 verdeutlicht, dass eine zytogenetische Kolokalisation zwischen FA-assoziierten Bruchereignissen und FSs bei allen vier Probanden in mehr als 60% der Chromatidbrüche auftrat. Unter Einbezug der potentiell kolokalisierenden Bruchereignisse konnte eine über 80%ige Übereinstimmung der zytogenetischen Lage der Brüche zu FSs beobachtet werden. Bruchereignisse, welche nicht mit FSs übereinstimmten, traten mit ca. 16% ebenfalls in ähnlicher Häufigkeit bei allen vier Probanden auf (die der Abbildung 5.5 zugrunde liegenden Daten Daten finden sich in Tabelle 8.5 des Anhangs). Unter Abschnitt 6.3.1.3 der Diskussion werden diese Ergebnisse im Vergleich zur derzeitigen Studienlage beurteilt.

435 Bruchereignisse, welche innerhalb des Aph-behandelten Materials der Kontrollpersonen auftraten, wurden ebenfalls bezüglich ihrer zytogenetischen Lage bewertet. Erwartungsgemäß traten in diesem Material 90,11% der Chromatidbrüche innerhalb FSs auf. 6,67% der Brüche wurden in anderen nicht als FSs beschriebenen Banden, wie z.B. einigen Zentromeren beobachtet. 3,22% der Bruchereignisse dieser Versuchsreihe waren potentielle FSs. Dies betraf Brüche innerhalb der Banden 7q31 sowie 14q24, da für diese Banden je zwei FSs innnerhalb der Subbanden beschrieben sind.

5.1.2.3.3 Vergleich der Expressionsraten von FSs und FA-assoziierten Bruchereignissen

Bei der Beurteilung der Expressionsraten der Bruchereignisse wurden ebenfalls die methodisch bedingte Auflösungsgrenze sowie die variablen Bandenstadien der MPP berücksichtigt. Auch hier galt es Bruchereignisse, welche Auflösungsbedingt den Grenzbereichen zweier Banden zugeordnet wurden sowie Bruchereignisse, welche in Sub- und übergeordneten Banden auftraten, zu beachten. Die beschriebenen Bereiche wurden zur Beurteilung der Expressionsrate der einzelnen Bruchpunkte als eigenständige Banden gewertet. Auf diese Weise wurde ein Informationsverlust durch Vernachlässigung der Bruchereignisse innerhalb der Subbanden bzw. die Verzerrung der Daten durch spekulative Zuordnung von Bruchereignissen übergeordneter Banden in mögliche Subbanden vermieden. Infolgedessen weichen die hier differenzierten Bruchpunkte in ihrer Anzahl von den Angabe unter 5.1.2.3.1 ab.

Die Tabelle 5.8 zeigt einen Vergleich der häufigsten Bruchpunkten der MMC-behandelten FA-Suspensionen (MMC-Material) mit denen der Aph-behandelten Suspensionen der Kontrollpersonen (Aph-Material). Zudem sind die für die Kartierung ausgewählten Bruchpunkten aufgeführt. Die Häufigkeit bezeichnet hierbei den Anteil der Bruchereignisse innerhalb einer bestimmten chromosomalen Region bezogen auf die Gesamtanzahl der Bruchereignisse in der jeweiligen Versuchsreihe (MMC-behandeltes FA-Material: n = 4184, Aph-behandeltes Material der Kontrollpersonen: n = 435).

Tab. 5.8: Übersicht über die durchschnittliche Häufigkeit ausgewählter, kolokaliserender Bruchereignisse in MMC-behandelten FA-Material und Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen unter Angabe der Bandengröße des haploiden Karyotyps sowie der chromatischen Eigenschaft der jeweiligen Bande.

Zytogenetische Lage	**Fragile Site**	**Chromat. Bandentyp**	**Bandengröße in Mbp**	**Anteil im MMC-Material**	**Anteil im Aph-Material**
1p36	FRA1A	hell	28,0	2,03%	0,23%
1p32	FRA1B	hell	10,6	0,88%	0,23%
1p22	FRA1D	hell	9,8	0,55%	1,61%
1p21	FRA1E	dunkel	12,5	0,10%	0,46%
1q21	FRA1F	hell	12,4	1,58%	0,23%
1q25	FRA1G	hell	12,9	0,72%	0,46%
1q31	FRA1K	dunkel	12,9	0,31%	0,23%
3p21	FRA3H	hell	10,7	1,46%	0,69%
3p14.2	FRA3B	hell	15,4	0,38%	15,63%
7q11.23	FRA7J	hell	5,3	1,03%	0,69%
11q13	FRA11H	hell	13,7	1,03%	0,23%
16q23.2	FRA16D	hell	10,1	0,24%	11,49%
Xp22.31	FRAXB	hell	9,5	0,43%	7,13%

Tabelle 5.8 verdeutlicht, dass die Expressionsraten der Bruchpunkte in beiden Versuchsreihen variieren. Im MMC-behandelten FA-Material traten in 441 verschiedene chromosomale Regionen Bruchereignissen auf. Darunter befanden sich 54 Grenzbereiche zweier Banden sowie 31 Banden, deren Subbanden ebenfalls Bruchereignisse aufwiesen. Bezogen auf die Gesamtanzahl aller Brüche dieser Versuchsreihe (n = 4184) schwankte die ermittelte Häufigkeit von Bruchereignissen innerhalb der einzelnen Bruchpunkte zwischen 1,58% (1q21) und 0,02% (Einzelbrucheregnisse, bspw. in 2p16). Lediglich 6 der 441 von Bruchereignissen betroffenen Regionen zeigten eine Häufigkeit von über 1,00%. 269 beinhalteten je zwischen 0,99% und 0,10% der Chromatidbrüche. Die übrigen 166 Regionen wiesen eine Expressionsrate von unter 0,10% auf.

Im Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen konnten in 130 unterschiedlichen chromosomalen Bereichen Bruchereignisse beobachtet werden. Darunter waren 7 Bruchpunkte in Grenzregionen zweier Banden und 3 in Banden, deren Subbanden ebenfalls Bruchereignis aufwiesen, zu verzeichnen. Die Häufigkeit variierte, bezogen auf die Gesamtzahl aller Brüche dieser Versuchsreihe (n = 435), zwischen 15,63% und 0,23% (Einzelbruchereignis). 19 Bruchpunkte wiesen eine Expressionsrate über 1,00% auf. 39 Bruchpunkte zeigten eine Häufigkeit zwischen 0,99 und 0,40%. Die übrigen 72 Bruchpunkte waren Einzelbruchereignisse und traten mit einer Häufigkeit von 0,23% auf.

Tabelle 5.8 ist zudem entnehmbar, dass FSs, welche im Material der Kontrollpersonen selten auftraten, im MMC-behandelten FA-Material häufiger zu verzeichnen waren. Die häufigsten FSs des Materials der Kontrollpersonen (bspw. FRA3B, FRA16D) waren dagegen im MMC-behandelten FA-Material nur selten zu beobachten. Sowohl im MMC-behandelten FA-Material als auch im Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen schwankten die Expressionsraten der Bruchpunkte interindividuell. Tabelle 5.9 verdeutlicht dies an einigen Beispielen.

Tab. 5.9: Interindividuelle Schwankung der Expressionshäufigkeit ausgewählter Bruchpunkte. Anmerkung: Index B: MMC-Behandlung, Index C: Aph-Behandlung.

Bruchpunkt	**Suspensionen**					
	Ko_{1C}	**Ko_{1C}**	**FA_{1B}**	**FA_{2B}**	**FA_{3B}**	**FA_{4B}**
FRA4A (4p16)	1,32%	0,00%	0,12%	1,34%	0,72%	0,48%
FRA7J (7q11.23)	0,88%	0,48%	0,46%	1,61%	1,11%	0,97%
FRA8A/B (8q22)	1,32 %	0,00%	0,81%	0,40%	0,33%	0,19%

Die o.g. Ergebnisse werden unter 6.3.1.2 bis 6.3.1.4 diskutiert. Einen Überblick über die Häufigkeit der einzelnen Bruchpunkte innerhalb der beiden Versuchsreihen gibt Tab. 8.3 des Anhangs, während in Tab. 8.14 die Fragilität der Bruchpunkte mit Hilfe der BINOMVERT-Funktion beurteilt wird.

5.1.3 Satellitenassoziationen (san)

Satellitenassoziationen konnten in allen Versuchsreihen beobachtet werden. Die Assoziation zweier oder mehr akrozentrischer Chromosomen wurde als eine Satellitenassoziation bewertet und zusätzlich zur Anzahl der Bruchereignisse aufgezeichnet. Sie wurden nicht in die statistische Auswertung chromosomaler Brüche und Figuren mit einbezogen. Insgesamt wurden 146 Satellitenassoziationen beobachtet, darunter 11 Assoziationen dreier akrozentrischer Chromosomen (7,53% der san) und eine Assoziation von vier akrozentrischen Chromosomen (0,68% der san). Die übrigen 91,79% der Satellitenassoziationen wurden aus zwei Chromosomen gebildet. Zu 94,50% trat eine Satellitenassoziation je Metaphase auf. In den übrigen 5,50% der Metaphasen mit Satellitenassoziationen konnten zwei Assoziationen beobachtet werden. Die Tabelle 8.6 des Anhangs gibt die Anzahl der beteiligten akrozentrischen Chromosomen in den einzelnen Suspensionen wieder. Abbildung 5.7 zeigt die Häufigkeit deren Beteiligung an Satellitenassoziation in Prozent. Auf eine weitere Beurteilung wurde verzichtet.

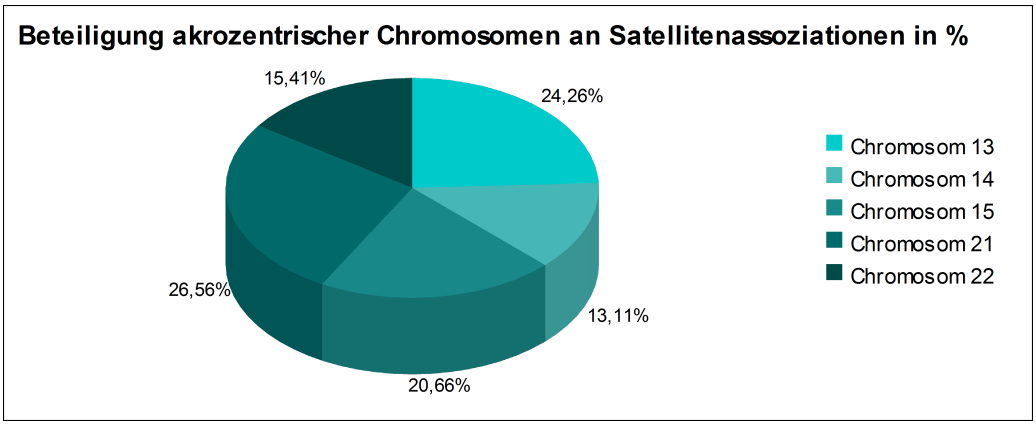


Abb. 5.7: Häufigkeit der Beteiligung der einzelnen akrozentrischen Chromosomen an san.

In Abbildung 5.7 ist erkennbar, dass keines der akrozentrischen Chromosomen in den beobachteten Satellitenassoziationen deutlich unter- bzw. überrepräsentiert ist.

5.1.4 Chromosomale Figuren

Als chromosomale Figuren wurden Rearrangements mehrerer Chromosomen, sogenannte Reunionsfiguren (rb), bewertet. Intrachromosomale Rearrangements, wie z.B. Ringchromosomen, wurden nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen. Insgesamt wurden 595 rb beobachtet. 532 rb (89,41%) wurden aus zwei Chromosomen, 53 rb (8,91%) aus drei, 8 rb (1,34%) aus vier und 2 rb (0,34%) aus fünf Chromosomen gebildet. Chromosomale Figuren, welche aus drei und mehr Chromosomen gebildet wurden, waren ausschließlich im MMC-behandelten Material der FA-Patienten zu beobachten. Eine Übersicht zu den an der Bildung von Reunionsfiguren beteiligten Chromosomenbanden findet sich in Tabelle 8.7 im Anhang.

5.1.4.1 Spontane Reunionsfiguren in unbehandelten FA-Suspensionen

Rund 0,7% aller rb traten spontan auf. Sie wurden im nativen Material der FA-Patienten in 1% der Metaphasen beobachtet. Die nativen Suspensionen der Kontrollpersonen wiesen hingegen keine rb auf. Folgende vier rb waren in den MPP der FA-Patienten zu verzeichnen: 15q14+11p12, 14p13+16p13, 1p36.3+9p24, 1p34+17p13. Alle beobachteten Figuren bestanden aus zwei beteiligten Chromosomen, welche mit Ausnahme von 1p34 sowie 15q14+11p12 eher innerhalb terminaler Banden verbunden waren. Die Abbildung 5.8 zeigt ein Beispiel einer spontanen rb in des FA-Patienten 3.

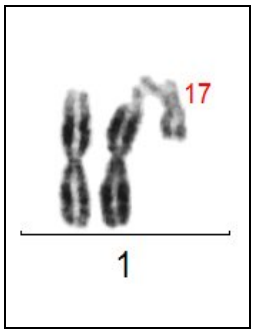


Abb. 5.8: Spontane rb im Bereich der Chromosomenbanden 1p34+17p13, Suspension FA_{3A}.

5.1.4.2 Reunionsfiguren in MMC-behandelten Suspensionen

569 rb wurden in MMC-behandeltem Material beobachtet. 12 rb (2,0% aller rb) waren dabei im Material der Kontrollpersonen zu verzeichnen. Die übrigen 93,6% (557 rb) traten in FA-Suspensionen auf. Die nachfolgende statistische Bewertung beruht ausschließlich auf den Ergebnissen des MMC-behandelten FA-Materials. Die Tabelle 5.10 gibt einen Überblick über die Rate der rb innerhalb der einzelnen FA-Suspensionen.

Tab. 5.10: Übersicht der Raten der rb innerhalb des MMC-behandelten FA-Materials sowie deren Mittelwert.

Suspension	**FA_{1B}**	**FA_{2B}**	**FA_{3B}**	**FA_{4B}**
Rate der rb	1,07	1,46	1,91	0,73
Mittelwert der Raten	1,29			

Tabelle 5.10 ist entnehmbar, dass die Anzahl der rb pro MPP (Rate der rb) innerhalb der einzelnen Suspensionen zwischen 0,73 und 1,91 variierte. Durchschnittlich waren rund 1,29 rb pro MPP zu verzeichnen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Rate der rb und der Charakteristik der Suspension ermittelt werden. Weder die Komplementationsgruppe der Probanden noch die Art des verwendeten Materials (Lymphozytensuspension bzw. Lymphoblastoid-Zelllinie) schienen einen systematischen Einfluss auf die Bildung von rb auszuüben. Die Reunionsfiguren wurden anschließend hinsichtlich der beteiligten Chromosomen und chromosomalen Banden untersucht.

Auf eine Beurteilung der Reunionsfiguren bezüglich ihrer Einteilung in di-, tri-, quadri- oder multiradial wurde verzichtet.

5.1.4.2.1 An Reunionsfiguren beteiligte Bruchpunkte

Im MMC-behandelten FA-Material wurden 285 verschiedene chromosomale Regionen, welche an der Bildung von rb beteiligt waren, beobachtet. Es waren in 183 hellen, 72 dunklen sowie in 30 heterochromatischen Banden des Zentromer- bzw. Subzentromerbereiches der Chromosomen 1, 3, 9, 16 und 19 Bruchereignisse zu verzeichnen. Abbildung 5.9 gibt die chromatischen Eigenschaften der an den Figuren beteiligten Bruchpunkte wieder.

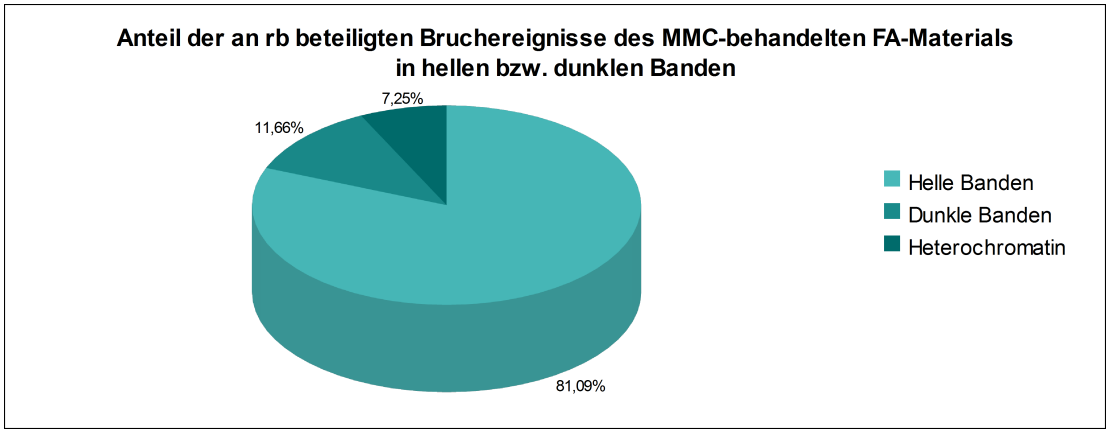


Abb. 5.9: Anteile der an rb beteiligten Bruchereignisse des MMC-behandelten FA-Materials in hellen bzw. dunklen Banden.

Abbildung 5.9 verdeutlicht, dass 81,09% der an rb beteiligten Bruchpunkte zytogenetisch in hellen, 11,66% in dunklen und 7,25% in heterochromatischen Banden lokalisiert waren. Im Vergleich mit Abbildung 5.3 zeigt sich die etwas stärkere Repräsentation der an rb beteiligten Bruchereignisse in hellen Banden. Die Tabelle 5.11 zeigt die Verteilung der Bruchpunkte innerhalb des Genoms.

Tab. 5.11: Überblick zur Anzahl der an rb beteiligten Bp, zur Gesamtanzahl der Bp des jeweilige Chromosoms sowie zum prozentualen Anteil der an rb beteiligten Bp jedes einzelnen Chromosoms.

Chromosom	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Bruchpunkte (gesamt)	23	25	23	22	21	20	19	17	17	15	18	15
Bruchpunkte (rb)	17	19	17	17	16	14	14	14	13	12	14	13
Anteil in %	73,9	76	73,9	77,3	76,2	70	73,7	82,4	76,5	80	77,8	86,7
Chromosom	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**X**	
Bruchpunkte (gesamt)	10	13	12	14	12	9	10	10	5	6	20	
Bruchpunkte (rb)	9	13	10	12	11	8	10	8	5	5	14	
Anteil in %	90	100	83,3	85,7	91,7	88,9	100	80	100	83,3	70	

Tabelle 5.11 verdeutlicht, dass nicht alle von Bruchereignissen betroffenen Regionen der einzelnen

Chromosomen auch an der Bildung von rb beteiligt waren. Der Anteil der an rb beteiligten Bruchpunkte variierte zwischen 70% und 100%. Im Mittel waren rund 82,5% der differenzierbaren Bruchpunkte auch in rb involviert.

Die Bruchereignisse innerhalb folgender Banden trugen am häufigsten zur Bildung von rb bei: 1p36.3 (2,02%), 3p21(1,77%), 11q13(1,51%), Xq22(1,51%), 10q26 (1,35%), 4p16 (1,18%). Unter den genannten sechs häufigsten Banden sind drei terminale Banden zu verzeichnen. 27,47% der an rb beteiligten Brüche traten innerhalb terminaler Banden auf und 6,25% der beteiligten Chromatidbrüche konnten im Zentromerbereich beobachtet werden. Die übrigen 66,28% waren eher zufällig über die Abschnitte der einzelnen Chromosomen verteilt. Eine wiederkehrende Anlagerung bestimmter chromosomaler Regionen zu einer rb konnte nicht beobachtet werden.

5.1.4.2.2 An Reunionsfiguren beteiligte Chromosomen

Wie bereits beschrieben konnte im MMC-behandelten FA-Material eine Beteiligung aller Chromosomen an rb beobachtet werden. Die einzelnen Chromosomen waren allerdings unterschiedlich oft in die Bildung von rb involviert. Tabelle 5.12 gibt eine Überblick über die Häufigkeit der Teilhabe der einzelnen Chromosomen an rb. Hierbei wird die relative Größe der einzelnen Chromosomen in % (Größe des Chromosoms in Mbp x 100/ Größe des Genoms in Mbp) mit dem relativen Anteil der in rb involvierten Bruchereignisse des jeweiligen Chromosoms in % verglichen.

Tab. 5.12: Übersicht zum Anteil der an rb beteiligten Brüche in % und des jeweiligen relativen Anteils am Genom der einzelnen Chromosomen.

Chromosom	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Anteil an rb in %	9,08	6,56	6,22	5,97	3,87	3,79	5,21	4,21	5,55	4,88	5,05	4,96
Anteil am Genom %	8,21	8,01	6,52	6,30	5,96	5,64	5,24	4,82	4,65	4,46	4,45	4,41
Chromosom	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**X**	
Anteil an rb in %	3,45	2,52	3,70	4,12	4,37	2,69	3,03	2,27	1,60	1,26	5,64	
Anteil am Genom %	3,79	3,54	3,38	2,98	2,67	2,57	1,95	2,08	1,59	1,69	5,11	

Der Vergleich der Daten aus Tab. 5.12 zeigt, dass die Beteiligung der Chromosomen an rb im Wesentlichen proportional zu deren Größe ist. Ausnahmen hiervon sind die Chromosomen 5, 6 und 14. Deren Beteiligung an rb ist nicht in dem Maße proportional zu deren Größe wie es bei Chromosomen ähnlicher Länge der Fall ist. Zudem ist die Beteiligung des Chromosoms X an rb bei allen vier FA-Patienten und in verschiedenen Bandenstadien hervorzuheben. Die Abbildungen 5.10a bis 5.10d verdeutlichen dies. Die Ergebnisse werden im Abschnitt 6.3.1.5 diskutiert.

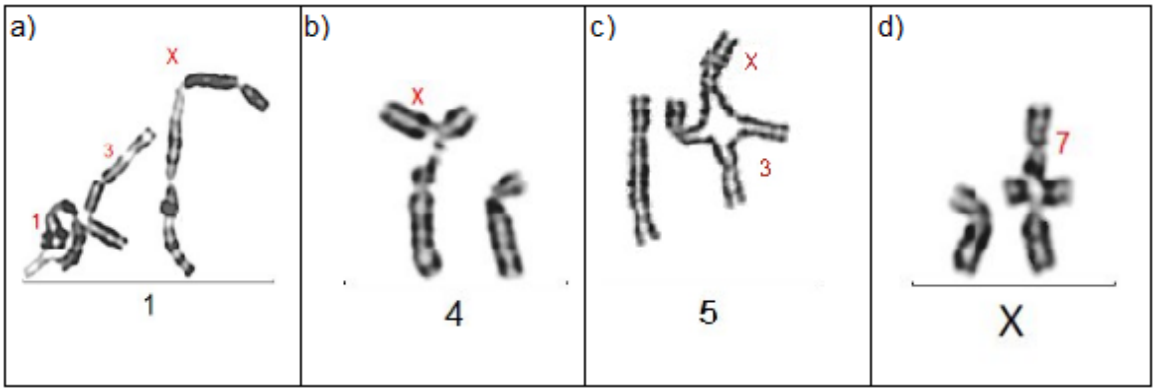


Abb. 5.10a-d: Reunionsfiguren mit Beteiligung des Chromosoms X; a: FA-Patient 1, 1p36.3+Xq28; b: FA-Patient 2, 4p11+Xq13; c: FA-Patient 3, 3q25+5q15+Xq22; d: FA-Patient 4, Xp11.2+7q22.

Wie den Abbildungen 5.10a bis 5.10d zu entnehmen ist, waren sowohl terminale als auch zentromernahe Banden des Chromosoms X an rb beteiligt. Abb. 5.9c zeigt zudem, dass Gonosomen auch an der Bildung von rb bestehend aus 3 beteiligten Chromosomen mitwirkten.

5.1.4.2.3 Kombination der Chromosomen zu Reunionsfiguren

In der Überprüfung der Zusammensetzung von rb, welche sich nur auf die beteiligten Chromosomen und nicht auf deren Bruchpunkte bezog, konnten wiederholt auftretende Kombinationen nachgewiesen werden. Insgesamt waren, bezogen auf die Kombination der beteiligten Chromosomen, 268 verschiedene Figuren im MMC-inkubierten FA-Material zu verzeichnen. 205 rb (76,49%) wurden aus zwei, 53 rb (19,78%) aus drei, 8 rb (2,99%) aus vier und 2 rb (0,74%) aus fünf beteiligten Chromosomen gebildet. 138 (51,49%) der 268 differenzierbaren Figuren traten mehrfach auf, die übrigen 48,51% der Figuren waren Einzelereignisse. Die Tabelle 5.13 gibt einen Überblick zu den am häufigsten beobachteten Kombinationen von Chromosomen.

Tab. 5.13: Übersicht zur Expression der häufigsten Chromosomenkombinationen der Figuren sowie zur Anzahl der innerhalb der einzelnen Suspensionen beobachteten Figuren.

Chromosomen-kombination	**FA_{1B}**	**FA_{2B}**	**FA_{3B}**	**FA_{4B}**	**Σ, n=557**
	Anzahl, n=107	**Anzahl, n=146**	**Anzahl, n=191**	**Anzahl, n=113**	**Anteil**
1 + 3	1	3	5	0	1,62%
1 + 1	2	0	5	1	1,44%
1 + 7	0	2	2	0	1,08%
1 + X	1	1	3	1	1,08%
2 + 11	1	1	2	2	1,08%

Tabelle 5.13 gibt die fünf häufigsten Chromosomenkombinationen der Figuren sowie deren

Beobachtungsanzahl innerhalb der FA-Suspensionen wieder. Reunionsfiguren aus den Chromosomen 1 und 3 traten mit 1,62% am häufigsten und die aus der Kombination zweier Chromosomen 1 am zweithäufigsten auf. Die Daten werden unter 6.3.1.5 diskutiert.

5.1.4.3 Reunionsfiguren in Aph-behandelten Suspensionen

In Aph-behandeltem Material waren 22 rb zu beobachten. Dies entspricht 3,7% aller Reunionsfiguren. 9 rb (1,5% aller rb) traten im Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen und 13 rb (2,2% aller rb) im Material der FA-Patienten auf. Alle im Aph-behandelten Material beobachteten rb wurden aus zwei beteiligten Chromosomen gebildet. Insgesamt waren 44 Brüche in 36 verschiedene chromosomalen Banden in die Bildung von rb involviert. 31,8% dieser Chromatidbrüche waren terminal gelegen. Die übrigen Bruchereignisse wiesen eine zufällige Verteilung auf. Auf eine weitere Bewertung wurde aufgrund der geringen Anzahl der Ereignisse verzichtet.

5.2 Ergebnisse der molekular-zytogenetischen Untersuchungen

Die in der vorliegenden Arbeit angewandten molekular-zytogenetischen Methoden galten zum einen der näheren Charakterisierung der Karyotypen des Untersuchungsgutes, sowie zum anderen der Kartierung selten auftretender Common Fragile Sites. Während für die molekular-zytogenetische Karyotypanalyse verschiedene Techniken Verwendung fanden, erfolgte die Kartierung der FSs ausschließlich mit Hilfe der Hybridisierung von BAC-Sonden im Rahmen der FISH. Die einzelnen Methoden werden an entsprechender Stelle aufgeführt.

5.2.1 Molekular-zytogenetische Karyotypanalyse

Während der zytogenetischen Beurteilung des nativen Untersuchungsgutes fielen sowohl bei FA-Patient 2 als auch bei FA-Patient 3 Besonderheiten auf, welche einer weiteren Bearbeitung bedurften.

5.2.1.1 Analyse des Karyotyps des FA-Patienten 2

In der zytogenetischen Untersuchung der nativen Suspension zeigte sich regelhaft ein aberranter Karyotyp von 49 Chromosomen. Durch Hybridisierung des M-FISH-Mixes konnte der Karyotyp näher charakterisiert werden (Abb. 5.11, siehe auch 4.5.2). Des Weiteren war ein verändertes Chromsom 11 in allen bearbeiteten MPP zu verzeichnen. Um dies präziser zu untersuchen, erfolgte die Hybridisierung des MCB-Mixes für das entsprechende Chromosom. Abbildung 5.12a zeigt das

Ergebnis dieser FISH und 5.12b das dazugehörige Markierungsschema (siehe 4.5.2). Mit Hilfe der Beschreibung der MCB Banken in Tab. 5.14 kann die molekular-zytogenetische Ausdehnung der Deletion bestimmt werden. Somit wurde folgender Karyotyp ermittelt: 49, XXX, del(11) (q14;q23.3), +12, +15. Die beschriebene Deletion wurde nicht als Bruchereignis gewertet. Wie im Kapitel 4.1.2 erwähnt, handelt es sich bei diesem Probanden um eine Lymphoblastoid-Zelllinie.

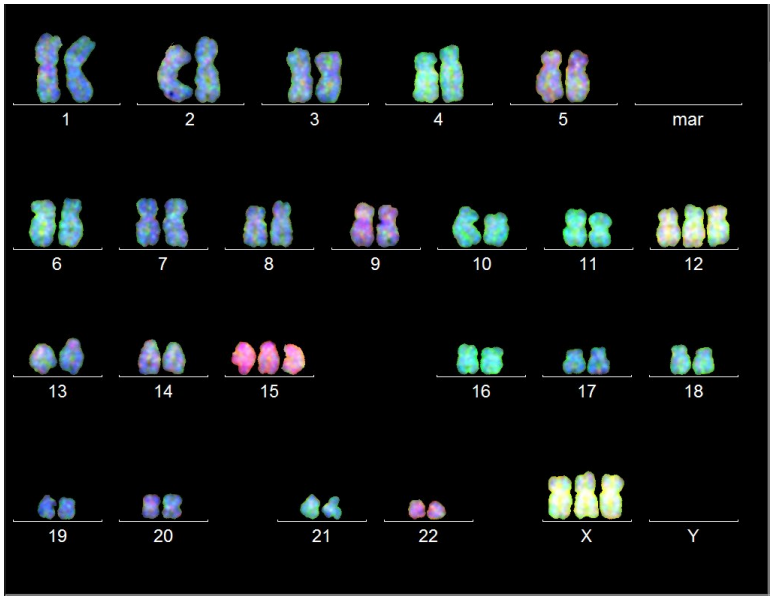


Abb. 5.11: Ergebnis des M-FISH-Mix auf native MPP des FA-Patienten 2. Karyotyp: 49,XXX,+12,+15.

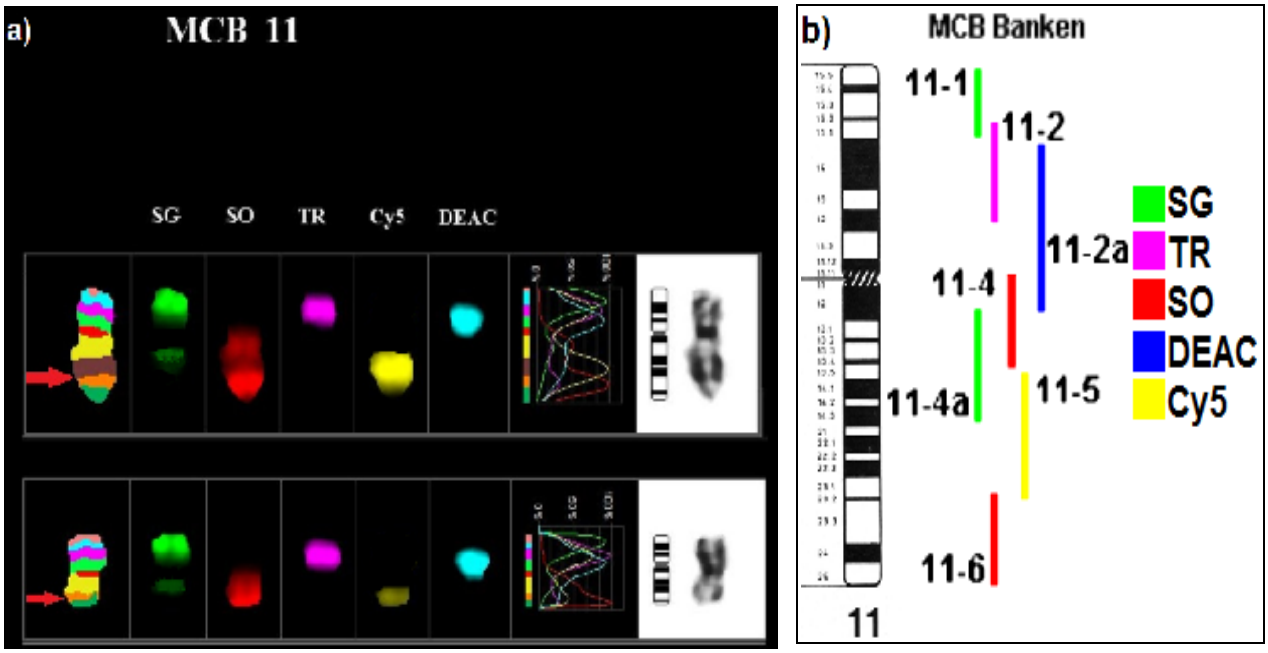


Abb. 5.12a und b. a: Ergebnis der Hybridisierung des MCB-Mixes für das Chromosom 11 auf nativer MPP des FA-Patienten 2, rote Pfeile: Deletion im Bereich 11q14 bis 11q23.3, Falschfarben: Deletion der braunen und teilweise Deletion der orangen Bande. b: Markierungsschema des MCB-Mixes für das Chromosom 11.

Tab. 5.14: Ausdehnung der MCB Banken des MCB-Mixes für das Chromosom 11.

MCB Bank	Markierung	Banden nach Chipdaten	Mbp nach Chip
11-1	SG	pter-p15.1	0.00-20.76
11-2	TR	p15.2-p12	15.15-38.03
11-2a	DEAC	p15.1-q12.2	18.16-60.76
11-4	SO	p11.12-q14.1	50.20-72.04
11-4a	SG	q12.1-q14.3	58.46-90.55
11-5	Biotin-16-dUTP detektiert mit Cy5	q13.5-q23.2	76.26-113.31
11-6	SO	q23.1-qter	112.43-134.37

5.2.1.2 Analyse des Karyotyps des FA-Patienten 3

Die zytogenetische Untersuchung der nativen Suspension des FA-Patienten 3 zeigte eine Trisomie 9 in ca. 11% der Lymphozyten. Zur Beurteilung eines möglichen kongenitalen Mosaiks erfolgte die Bearbeitung einer Probe eines zweiten Gewebes des Probanden. Hierfür wurden Zellen der oralen Mukosa mittels Interphase-FISH bewertet. Abbildung 5.13 zeigt das Ergebnis der Interphase-FISH. Hierbei sind drei blaue Signale der Sonde des Zentromers 9 (cep9, Abbott®) erkennbar. Durch die Hybridisierung der BCR-ABL Dual Color Sonde (Abbott®) wurde das Ergebnis verifiziert. Die drei roten Signale der ABL-Sonde, welche im Bereich 9q34 hybridisierten, bestätigten die Trisomie, während die beiden grünen Signale der BCR-Sonde (22q11.2) eine mögliche Triploidie ausschlossen. In 15% der untersuchten Zellen der Mundschleimhaut konnte eine Trisomie 9 nachgewiesen werden. Demnach liegt bei dem Probanden mit hoher Wahrscheinlichkeit ein kongenitales Mosaik vor, dessen mögliche Konsequenzen unter Abschnitt 6.3.2.2 diskutiert werden.

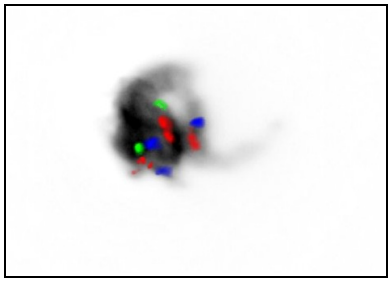


Abb. 5.13: Interphase-FISH der oralen Mukosa des FA-Patienten 3. Legende: blaues Signal: Zentromer 9 (cep9 Spectrum Aqua, Abbott®); rotes Signal: 9q34 (LSI ASS-ABL Spectrum Orange, Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Abbott®); grünes Signal: 22q11.2 (BCR Spectrum Green,Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Abbott®).

5.2.2 Ergebnisse der Charakterisierung ausgewählter Common Fragile Sites

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der molekular-zytogenetischen Untersuchung der in Tabelle 4.3 aufgeführten Bruchpunkte beschrieben. Die Beurteilung der Hybridisierungen erfolgte anhand des in Abschnitt 4.8.2 beschriebenen Schemas.

Zunächst wurde in Präparaten MMC-behandelter FA-Suspensionen die Ausdehnung der zytogenetisch kolokalisierenden Bruchpunkte mit Hilfe von BACs bestimmt und anschließend im Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen die Übertragbarkeit der molekular-zytogenetischen Ergebnisse auf selten auftretende CFSs überprüft. Die molekular-zytogenetische Kolokalisation und somit die Übertragbarkeit der Kartierungsergebnisse des FA-Materials auf CFSs galten als bestätigt, wenn Bruchpunkt-spezifische BACs in Metaphasepräparaten der Kontrollpersonen im Bereich des zytogenetisch kolokalisierenden Bruchpunktes hybridisierten und dessen Grenzen definierten. Die Hybridisierung der BACs wurde am Material aller vier von FA betroffenen Probanden durchgeführt und die Ergebnisse in Anlehnung an Fechter *et al.* in ihrer Gesamtheit interpretiert (Fechter *et al.* 2007). Dabei spiegeln BACs, welche in einem Teil der Versuche am proximalen und im anderen Teil am distalen Bruchpunkt der FS hybridisierten das Zentrum der FS wider, während BACs, welche stets proximal bzw. distal der FS lagen, den jeweiligen Grenzbereich der FS markieren. Eine Probanden-spezifische Analyse der Hybridisierungsergebnisse erfolgte exemplarisch für FRA1G. Hierbei zeigte sich, dass sowohl proximaler als auch distaler Bruchpunkt für alle vier FA-Patienten auf molekular-zytogenetischer Ebene identisch waren (siehe Tabelle 8.8 des Anhangs). Infolgedessen wird innerhalb der anschließenden Betrachtungen auf eine Differenzierung der Ergebnisse hinsichtlich der Probanden verzichtet. Aufgrund der Seltenheit der ausgewählten FSs war es erforderlich, zusätzliche MPP für die molekular-zytogenetischen Bearbeitung gezielt auf den OTs aufzusuchen. Hierbei wurde auf die zytogenetische Beurteilung der übrigen Chromosomen der jeweiligen MPP verzichtet. Um eine Verzerrung der statistische Daten zu vermeiden, wurden diese MPP nicht in die unter Abschnitt 5.1 beschriebenen Auswertung miteinbezogen.

5.2.2.1 Molekular-zytogenetische Charakterisierung von FRA1B (1p32)

Zur molekular-zytogenetischen Kartierung von FRA1B wurden 12 BACs verwendet. Der proximalste Bp wurde mit Hilfe des BAC RP5-1043G4 bestimmt. RP4-662P1 zeichnete den am weitesten distal gelegenen Bp der FS aus. FRA1B hat somit eine maximale Ausdehnung von rund 7,37 Mbp und konnte im Bereich von 1p32.3 bis 1p31.3 lokalisiert werden. Das ca. 5,51 Mbp große Zentrum der fragilen Region wurde zwischen den BACs RP5-1070D5 und RP4-668G5 beobachtet und erstreckt sich von 1p32.1 bis 1p32.2. Dieser Bereich ist am häufigsten von Bruchereignissen betroffen. Abbildung 5.14 illustriert die Einteilung in Zentrum bzw. Grenzbereiche der FS und zeigt die Lage der grenznahen BACs (dunkelgrüne Blöcke) und wurde in veränderter Form aus dem „UCSC Genome Browser“ entnommen. Tab. 5.15 gibt die Hybridisierungsergebnisse aller vier FA-Patienten sowie deren Kolokalisation zu FRA1B innerhalb des Materials der Kontrollpersonen wieder.

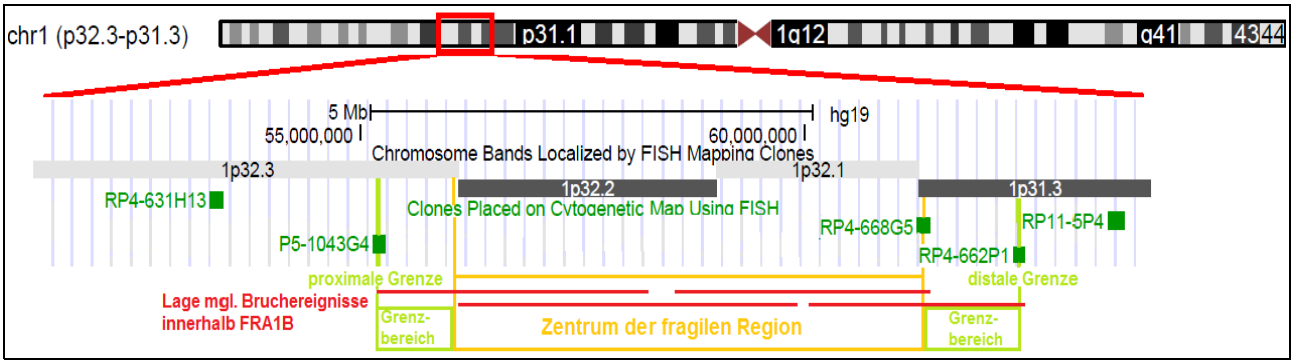


Abb. 5.14: Grafische Darstellung des Zentrums sowie der Grenzbereiche von FRA1B, verändert nach UCSC.

Tab. 5.15: Hybridisierungsergebnisse für die FS FRA1B. Anmerkung: n.g.= nicht geprüft.

BAC	Start (Mbp)	Stop (Mbp)	Lage des BAC zur FS					Kolokalisation
			proximal	prox. Bp	innerhalb	dist. Bp	distal	
RP11-470H9	52.298	52.400	6	1				n.g.
RP4-631H13	53.306	53.421	3	1				n.g.
RP5-1043G4	55.123	55.250	2	3	3	3		ja
RP5-1070D5	55.905	55.918		2		2		n.g.
RP4-710M16	56.825	56.951		3	1	3		n.g.
RP11-342F23	58.969	59.017		3	3			n.g.
RP11-467C18	59.745	59.896		1		2		n.g.
RP11-575B7	60.454	60.622			1	3		n.g.
RP4-668G5	61.331	61.418		1	4	3		ja
RP4-662P1	62.358	62.501			1	1	3	n.g.
RP11-5P4	63.452	63.568				1	1	n.g.
RP11-430H12	66.028	66.159					5	n.g.

Die Abbildungen 5.15a-d stellen die Ergebnisse der Hybridisierungen innerhalb des Materials der FA-Patienten sowie der Kontrollpersonen gegenüber.

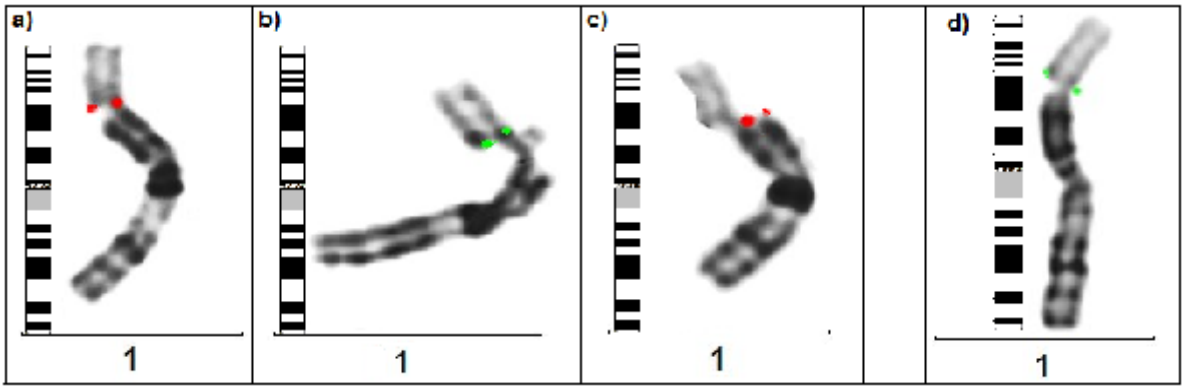


Abb. 5.15a-d: Hybridisierungen für FRA1B: a-c = im FA-Material, d = im Material der Kontrollpersonen. a: RP5-1043G4 (rot) proximal, b: RP5-1070D5 (grün) prox. Bp, c: RP4-668G5 (rot) dist. Bp; d: RP5-1043G4 (grün) proximal.

In Tab. 5.16 wird die Strukturanalyse der FRA1B mittels www.repeatmasker.org hinsichtlich des GC-Basenpaar-Anteils (GC%) und des Gehalts an repetitiven Elementen sowie die Analyse der Flexibilität des jeweiligen DNA-Abschnittes unter Zuhilfenahme von TwistFlex® (http://margalit.huji.ac.il/cgi-margalit/TwistFlex/TwistFlex.cgi) veranschaulicht. Hierzu wurde mit Hilfe eines „C-Programmes“ die DNA-Sequenz des Chromosoms 1, welche als ASCII-Code von der „ensembl“-Datenbank (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-70/fasta/homo_sapiens/dna/) abrufbar ist, für die in Tab. 5.16 aufgezeigten Regionen ausgelesen und durch den „cross_match“-Suchalgorithmus (Version 1.080812) von www.repeatmasker.org bearbeitet. Die von www.repeatmasker.org ausgegebenen Datenblätter können im Anhang als Abb. 8.3a-c eingesehen werden. Die Untersuchung der Flexibilität wurde mittels TwistFlex® unter Verwendung der empfohlenen Einstellungen (Fenstergröße: 100bp, Schrittgröße: 1bp, Grenzwert für erhöhte Flexibilität: 13,7°) für die in Tab. 5.16 beschriebenen Regionen durchgeführt (Mishmar *et al*. 1998, Zlotorynski *et al*. 2003). Inseln erhöhter Flexibilität werden als Flexibilitäts-Peak bezeichnet.

Tab. 5.16: Sequenz- und Flexibilitäts-Analyse der FRA1B.

Region in bp	**GC in%**	**SINEs in%**	**LINEs in%**	**LTR Elemente in%**	**DNA Elemente in%**	**Total interspersed repeats in%**	**Peak der Flexibilität (Anzahl)**
Proximale Grenze: 55 123 805 55 905 370	44,74	18,91	20,07	11,76	3,97	54,74	ja (13)
Zentrum: 55 905 371 bis 61 418 672	40,30	13,77	24,15	10,22	4,04	52,28	ja (258)
Distale Grenze: 61 418 673 bis 62 501 834	40,11	20,05	14,08	5,50	3,28	42,94	ja (51)

Tab. 5.16 zeigt die strukturellen Eigenschaften von FRA1B auf. Die erhobenen Daten werden unter Abschnitt 6.3.2.3.2 mit denen der übrigen bearbeiteten FSs verglichen. Tab. 8.9 des Anhangs gibt einen Überblick zu innerhalb FRA1B lokalisierten Tumor-assoziierten Gene, zu der Funktion und Expression des codierten Proteins sowie zu typischen assoziierten Tumorentitäten. Es werden diejenigen Gene aufgeführt, für deren codierte Proteine in humanen Tumorgewebeproben eine veränderte Expression nachgewiesen werden konnte. Gene, welche auf diese Art und Weise bisher nicht untersucht wurden, werden vernachlässigt. Traten Amplifikationen oder Deletionen der betreffenden Gene bzw. chromosomale Rearrangements auf, werden diese ebenfalls angegeben. Unter Abschnitt 6.3.2.3.3 der Diskussion erfolgt der Vergleich der FSs bezüglich chromosomaler Aberrationen und möglicher betroffener Gene.

5.2.2.2 Molekular-zytogenetische Charakterisierung von FRA1D (1p22)

Die molekular-zytogenetische Kartierung von FRA1D erfolgte mit Hilfe von 7 BACs. Der proximalste Bp wurde durch den BAC RP5-1043L3 bestimmt, während RP4-621B10 den am weitesten distal gelegenen Bp der FS kennzeichnet. FRA1D wurde mit der Ausdehnung von rund 4,98 Mbp im Bereich von 1p22.1-1p22.3 lokalisiert. Das Zentrum der fragilen Region wird durch RP11-125P20 sowie RP11-507I14 begrenzt, liegt im Bereich von 1p22.2 und besitzt eine Größe von ca. 3,59 Mbp. Abbildung 5.16 gibt die Grenzbereiche sowie das Zentrum der fragilen Region und die relative Lage der grenznahen BACs wieder. Tab. 5.17 zeigt die Hybridisierungsergebnisse im FA-Material sowie die Kolokalisation zu FRA1D innerhalb des Materials der Kontrollpersonen.

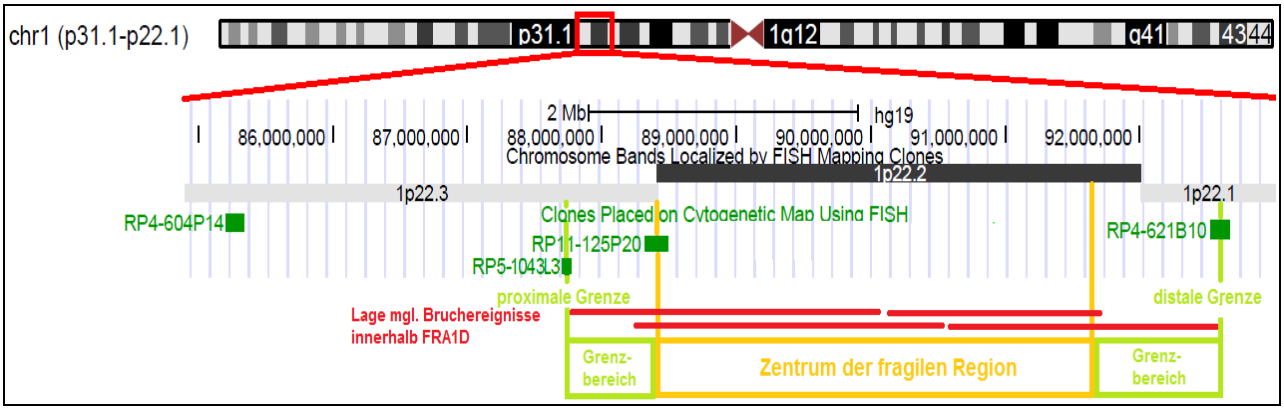


Abb. 5.16: Grafische Darstellung des Zentrums sowie der Grenzbereiche von FRA1D, verändert nach UCSC.

Tab. 5.17: Hybridisierungsergebnisse für die FS FRA1D. Anmerkung: n.g. = nicht geprüft.

BAC	**Start (Mbp)**	**Stop (Mbp)**	**Lage des BAC zur FS**					**Kolokalisation**
			proximal	**prox. Bp**	**innerhalb**	**dist. Bp**	**distal**	
RP4-604P14	85.240	85.334	4					n.g.
RP5-1043L3	87.677	87.777	4	2	3			ja
RP11-125P20	88.091	88.254	1	5	2	5		ja
RP4-644F6	89.820	89.903		1	2	4	3	n.g.
RP11-507I14	91.605	91.687		1	1	1	1	ja
RP4-621B10	92.519	92.659				4	2	n.g.
RP11-14O19	95.805	95.849				4	7	n.g.

Die Abbildungen 5.17a-d zeigen Hybridisierungsergebnisse des MMC-behandelten Material der FA-Patienten sowie der Aphidicolin-inkubierten Suspensionen der Kontrollpersonen. Mit Hilfe der durch die BAC-Hybridisierung ermittelten Grenzbereiche erfolgte die Strukturanalyse von FRA1D bezüglich repetitiver Sequenzen und DNA-Flexibilität analog zum Vorgehen bei FRA1B. Tab. 5.18 gibt eine Übersicht hierzu. Die Abb. 8.4a-c des Anhangs zeigen die von www.repeatmasker.org ausgegebenen Datenblätter der in Tab. 5.18 angegebenen Regionen.

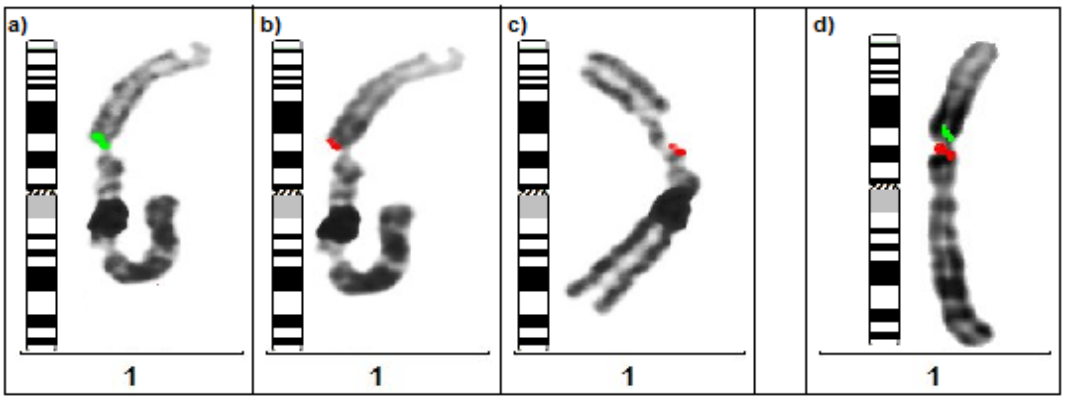


Abb. 5.17a-d: Hybridisierungen für FRA1D: a-c = im FA-Material, d = im Material der Kontrollpersonen. a: RP5-1043L3 (grün) proximal, b: RP11-125P20 (rot) prox. Bp, c: RP4-621B10 (rot) dist. Bp; d: RP5-1043L3 (grün) proximal und RP11-507I14 (rot) dist. Bp.

Tab. 5.18: Sequenz- und Flexibilitäts-Analyse der FRA1D.

Region in bp	**GC in%**	**SINEs in%**	**LINEs in%**	**LTR Elemente in%**	**DNA Elemente in%**	**Total interspersed repeats in%**	**Peak der Flexibilität (Anzahl)**
Proximale Grenze: 87 677 974 bis 88 319 382	39,49	10,82	17,61	9,11	4,16	41,78	ja (14)
Zentrum: 88 319 383 bis 91 687 502	38,82	10,61	25,96	10,06	3,86	50,66	ja (151)
Distale Grenze: 91 687 503 bis 92 659 879	40,26	17,99	21,98	9,13	3,27	52,72	ja (20)

Tab. 5.18 gibt die Sequenz- und Flexibilitäts-Analyse der FRA1D wieder. Unter Abschnitt 6.3.2.3.2 werden die hier aufgeführten Ergebnisse mit denen der übrigen analysierten FS verglichen. Die innerhalb von FRA1D liegenden Tumor-assoziierten Gene werden im Anhang in Tab. 8.10 aufgeführt. Ebenso wie bei den innerhalb FRA1B lokalisierten Genen wurden auch hier nur diejenigen berücksichtigt, für deren codierte Proteine eine veränderte Expression in humanen Tumorgewebeproben beobachtet wurde. Trat die veränderte Expression im Rahmen chromosomaler Aberrationen auf, werden auch diese mit aufgeführt. Unter Abschnitt 6.3.2.3.3 erfolgt die Diskussion der erhobenen Daten.

5.2.2.3 Molekular-zytogenetische Charakterisierung von FRA1E (1p21)

FRA1E nimmt im Rahmen der vorliegenden Studie eine Sonderstellung ein. Diese FS wurde zur Überprüfung der These der Studie genutzt. FRA1E wurde bereits durch Hormozian *et al.* molekular-zytogenetisch charakterisiert (Hormozian *et al.* 2007). Die dort hybridisierten BACs wurden zur Bearbeitung der FA-assoziierten Bruchereignisse der vorliegenden Studie verwendet

und deren Kolokalisation nachgewiesen. Bei der Beurteilung gilt es die abweichend verwendete Terminologie zu beachten. Hormozian *et al.* bezeichnen p-telomerwärts vom Bp gelegene BACs als distal, während in der vorliegenden Studie q-telomerwärts gelegene BACs als distal bewertet wurde. Das Zentrum der FS konnten Hormozian *et al.* zwischen RP11-526F14 und RP11-145D11 mit einer Ausdehnung von 370 kbp charakterisieren (Hormozian *et al.* 2007). Auch im FA-Material wies FRA1E in diesem Bereich das Zentrum der fragilen Region auf. Auf die Analyse der FS hinsichtlich repetitiver Elemente, Flexibilität sowie enthaltener Gene wurde innerhalb der vorliegenden Studie verzichtet, da die Referenzpublikation dies bereits ausführlich beschreibt. Die Tabelle 5.19 gibt die Hybridisierungsergebnisse der verwendeten BACs im FA-Material wieder. Waren die exakten BACs aus Hormozian *et al.* nicht verfügbar, wurde auf BACs mit ähnlicher Mbp-Zahl zurückgegriffen. Tab. 5.19 zeigt, dass die Kartierung von FRA1E im MMC-behandelten FA-Material mit den Ergebnissen von Hormozian *et al.*, welche durch Kartierung innerhalb Aph-behandelten Materials bestimmt wurden, übereinstimmt. Die Abbildungen 5.18a-c zeigen typische Hybridisierungsergebnisse für FRA1E innerhalb des FA-Materials.

Tab. 5.19: Hybridisierungsergebnisse für die FS FRA1E. Anmerkung: Kolokalisation bezogen auf Referenzpublikation von Hormozian *et al.* 2007.

BAC	**Start (Mbp)**	**Stop (Mbp)**	**Lage des BAC zur FS**					**Kolokalisation**
			proximal	**prox. Bp**	**innerhalb**	**dist. Bp**	**distal**	
RP11-14O19	95.805	95.849	4	2				ja
RP11-147C23	96.476	96.626	3	2				ja
RP11-526F14	97.749	97.807	1	3	1			ja
RP11-359C24	97.819	98.003		2	3			ja
RP11-145D11	98.003	98.121		1	3	3	1	ja
RP11-272L13	98.230	98.424			1	3	1	ja
RP11-84O12	100.986	101.155					3	ja

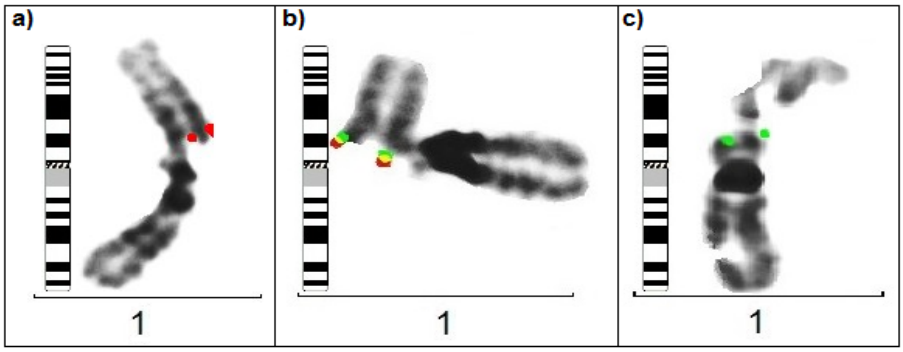


Abb. 5.18a-c Hybridisierungsergebnisse für FRA1E. a: RP11-526F14 (rot) proximal, b: RP11-359C24 (grün) prox. Bp und RP11-272L13 (rot) innerhalb, c: RP11-145D11 dist. Bp.

5.2.2.4 Molekular-zytogenetische Charakterisierung von FRA1F (1q21)

Zur molekular-zytogenetische Kartierung von FRA1F wurden 12 BACs verwendet. Der proximalste Bp wurde durch den BAC RP11-300L20 bestimmt, während RP11-422P24 den am weitesten distal gelegenen Bp der FS kennzeichnet. FRA1F konnte im Bereich von 1q21.1-1q21.3 mit einer Ausdehnung von ca. 8,30 Mbp lokalisiert werden. Das Zentrum der fragilen Region wird durch RP11-441L11 sowie RP11-216N14 begrenzt, liegt im Bereich von 1q21.2-1q21.3 und besitzt eine Größe von ca. 6,97 Mbp. Abbildung 5.19 zeigt die Grenzbereiche sowie das Zentrum der fragilen Region und die Lage der grenznahen BACs auf. Tabelle 5.20 gibt die Hybridisierungsergebnisse innerhalb des FA-Materials sowie deren Kolokalisation zu FRA1F innerhalb des Materials der Kontrollpersonen wieder.

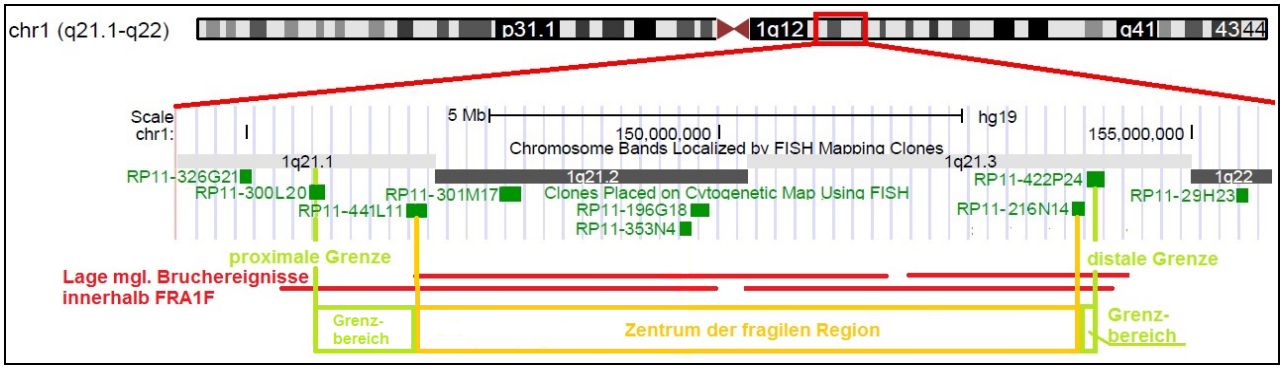


Abb. 5.19: Grafische Darstellung des Zentrums sowie der Grenzbereiche von FRA1F, verändert nach UCSC.

Tab. 5.20: Hybridisierungsergebnisse für die FS FRA1F. Anmerkung: n.g. = nicht geprüft.

BAC	Start (Mbp)	Stop (Mbp)	Lage des BAC zur FS					Kolokalisation
			proximal	prox. Bp	innerhalb	dist. Bp	distal	
RP11-326G21	144.931	145.057	5					n.g.
RP11-300L20	145.768	145.813	4	10	1			ja
RP11-441L11	146.871	147.044	1	5		2		ja
RP11-301M17	147.687	147.737	4	2	2			n.g.
RP11-666A1	148.511	148.684	2	2	2			n.g.
RP11-353N4	149.588	149.709	2	2	2			n.g.
RP11-196G18	149.709	149.898	4	5	3	1	1	n.g.
RP11-98D18	151.652	151.813			1	3		n.g.
RP1-110I3	152.524	152.574		3	3	2	2	n.g.
RP11-216N14	153.688	153.838		1	3	2	1	ja
RP11-422P24	153.893	154.067			2	3	5	ja
RP11-29H23	155.441	155.618				1	4	n.g.

Die Abbildungen 5.20a-d zeigen die Hybridisierungsergebnisse innerhalb des FA-Materials im Vergleich zu denen des Materials der Kontrollpersonen.

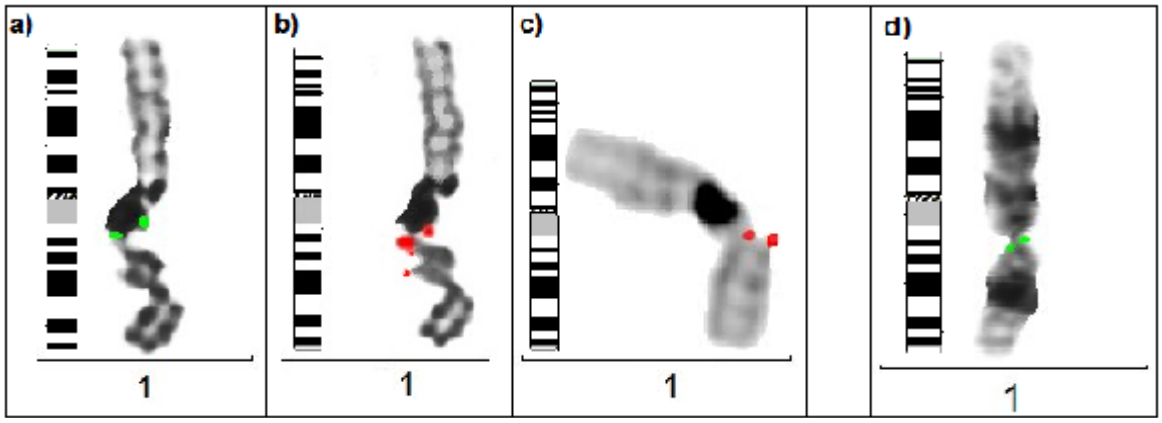


Abb. 5.20 a-d Hybridisierungen für FRA1F: a-c = im FA-Material, d = im Material der Kontrollpersonen. a: RP11-300L20 (grün) prox. Bp, b: RP11-216N14 (rot) innerhalb (Signal-Splitting), c: RP11-422P24 (rot) dist. Bp; d: RP11-422P24 (grün) dist. Bp.

Analog zum Vorgehen bei FRA1B erfolgte auch für FRA1F die Analyse der DNA-Sequenz hinsichtlich Flexibilitäts-Peaks, des GC-Gehalts sowie des Gehalts an repetitiven DNA-Motiven mittels des „cross_match"-Suchalgorithmus (Version 1.080812) von www.repeatmasker.org und TwistFlex®. Die Tab. 5.21 gibt die Ergebnisse dieser Analyse wieder. Im Anhang finden sich die Abb. 8.5a-c mit den entsprechenden Datenblättern der Sequenz-Analyse des Zentrums und der Grenzbereiche von FRA1F. Die Tab. 8.11 des Anhangs enthält eine Übersicht zu den innerhalb der FS gelegenen Tumor-assoziierten Genen, welche wie unter 5.2.2.1 beschrieben ausgewählt wurden.

Tab. 5.21: Sequenz-und Flexibilitäts-Analyse der FRA1F.

Region in bp	**GC in%**	**SINEs in%**	**LINEs in%**	**LTR Elemente in%**	**DNA Elemente in%**	**Total interspersed repeats in%**	**Peak der Flexibilität (Anzahl)**
Proximale Grenze: 145 768 518 146 871 193	41,41	9,85	25,16	5,37	1,60	42,29	ja (38)
Zentrum: 146 871 194 bis 153 838 214	43,15	17,55	17,80	7,20	2,55	45,51	ja (278)
Distale Grenze: 153 838 215 bis 154 067 677	45,89	39,86	10,72	3,95	2,15	56,68	ja (6)

Tab. 5.21 zeigt die Ergebnisse der Sequenz-Analyse der FRA1F. Auch diese werden im Abschnitt 6.3.2.3.2 der Diskussion mit den entsprechenden Ergebnissen der übrigen bearbeiteten FSs verglichen, während im Abschnitt 6.3.2.3.3 auf die innerhalb der FS liegenden Gene eingegangen wird.

5.2.2.5 Molekular-zytogenetische Charakterisierung von FRA1G (1q25)

Die molekular-zytogenetische Kartierung von FRA1G erfolgte mit Hilfe von 8 BACs. Der BAC RP11-97P20 lag dabei an der proximalsten Grenze des Bp, während mit RP11-254N18 die am weitesten distal gelegenen Grenze der FS gekennzeichnet wurde. FRA1G wurde mit der Ausdehnung von rund 10,65 Mbp im Bereich von 1q24.2-1q25.2 lokalisiert. RP11-277C14 sowie RP5-1026E2 begrenzen das Zentrum der FS. Dies liegt im Bereich von 1q25.1 und besitzt eine Größe von ca. 5,43 Mbp. Abbildung 5.21 zeigt die Grenzbereiche sowie das Zentrum der fragilen Region und die relative Lage der grenznahen BACs auf. Tabelle 5.22 gibt die Hybridisierungsergebnisse aller vier FA-Patienten sowie deren Kolokalisation zu FRA1G innerhalb des Materials der Kontrollpersonen wieder.

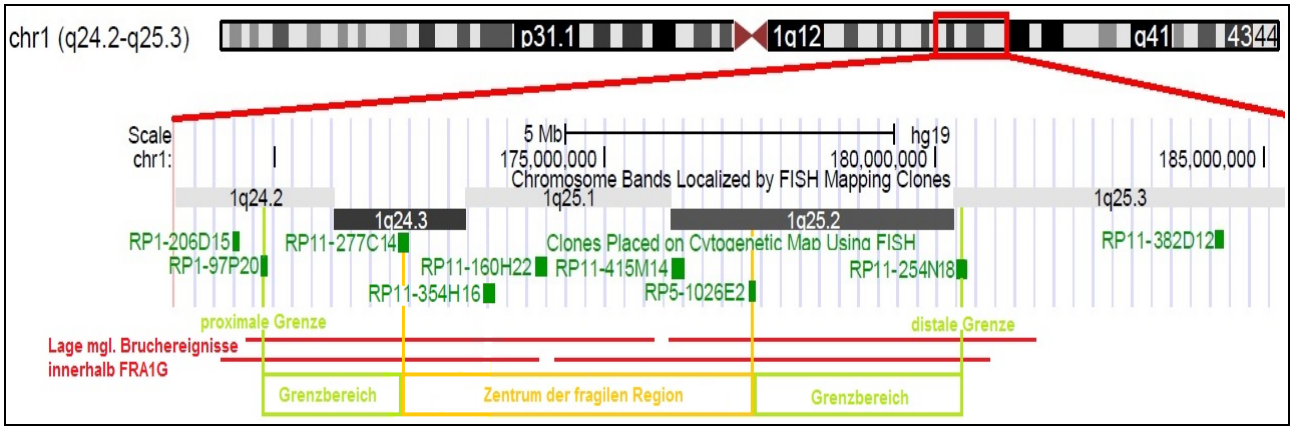


Abb. 5.21: Grafische Darstellung des Zentrums sowie der Grenzbereiche von FRA1G, verändert nach UCSC.

Tab. 5.22: Hybridisierungsergebnisse für die FS FRA1G. Anmerkung: n.g. = nicht geprüft.

BAC	**Start (Mbp)**	**Stop (Mbp)**	**Lage des BAC zur FS**					**Kolokalisation**
			proximal	**prox. Bp**	**innerhalb**	**dist. Bp**	**distal**	
RP1-206D15	169.356	169.456	9	3				ja
RP1-97P20	169.782	169.885		10				ja
RP11-277C14	171.863	172.019	1	4	1	1		n.g.
RP11-354H16	173.268	173.482	1	4	3	1		n.g.
RP11-160H22	173.955	174.121		3	3	4		n.g.
RP11-415M14	176.107	176.120		1	3	2		n.g.
RP5-1026E2	177.192	177.292		1	4	1		n.g.
RP11-254N18	180.307	180.436			6	7	5	ja
RP11-382D12	184.251	184.365				3	6	n.g.

Die Abb. 5.22a-d zeigen Beispiele typischer Hybridisierungsergebnisse im MMC-behandelten FA-Material bzw. im Aph-inkubierten Material der Kontrollpersonen.

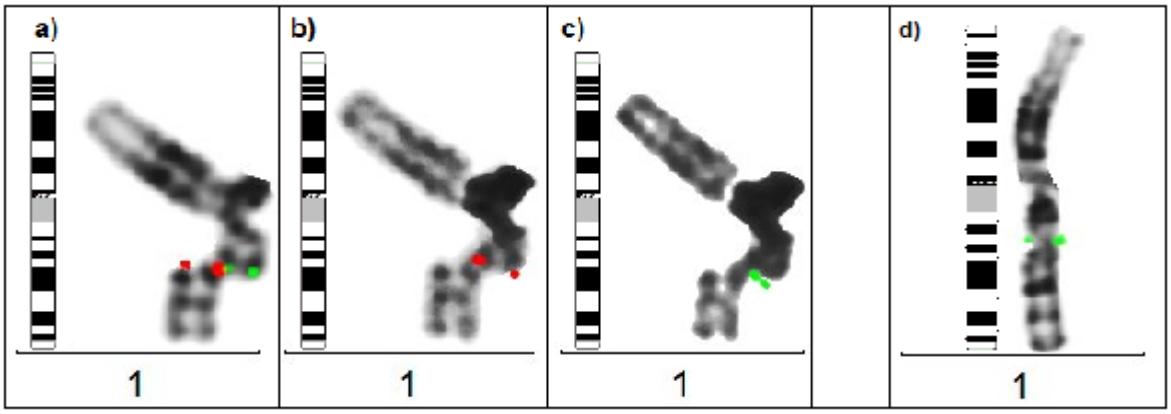


Abb. 5.22a-d, Hybridisierungen für FRA1G: a-c = im FA-Material, d = im Material der Kontrollpersonen. a: RP11-206D15(grün) proximal und RP11-254N18(rot) dist. Bp, b: RP11-277C14(rot) prox. Bp, c: RP5-1026E2(grün) innerhalb; d: RP1-97P20 (grün) prox. Bp.

Die Untersuchung der DNA-Sequenz von FRA1G hinsichtlich Flexibilitäts-Peaks, des GC-Gehalts sowie des Gehalts an repetitiven DNA-Motiven wurde ebenfalls mittels des „cross_match"-Suchalgorithmus (Version 1.080812) von www.repeatmasker.org und TwistFlex® durchgeführt. Die Tab. 5.23 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung des Zentrums sowie der beiden Grenzbereiche der FS, welche im Abschnitt 6.3.2.3.2 mit denen der übrigen bearbeiteten FSs verglichen werden. Die Abb. 8.6a-c des Anhangs beinhalten die Datenblättern von www.repeatmasker.org der jeweiligen Regionen von FRA1G. Die Tab. 8.12 zeigt eine Übersicht zu den innerhalb der FS gelegenen Tumor-assoziierten Genen, den jeweils codierten Proteinen und deren Expression in typischen Tumorgeweben. Diese wurden ebenfalls wie unter Abschnitt 5.2.2.1 beschrieben ausgewählt und werden im Abschnitt 6.3.2.3.3 diskutiert.

Tab. 5.23: Sequenz- und Flexibilitäts-Analyse der FRA1G.

Region in bp	**GC in%**	**SINEs in%**	**LINEs in%**	**LTR Elemente in%**	**DNA Elemente in%**	**Total interspersed repeats in%**	**Peak der Flexibilität (Anzahl)**
Proximale Grenze: 169 782 106 bis 171 863 203	38,61	11,57	27,42	11,14	4,36	54,69	ja (76)
Zentrum: 171 863 204 bis 177 292 468	39,66	11,57	26,39	9,42	3,98	51,63	ja (236)
Distale Grenze: 177 292 469 bis 180 436 544	40,56	15,42	26,45	6,15	4,28	52,57	ja (205)

5.2.2.6 Molekular-zytogenetische Charakterisierung von FRA1K (1q31)

Zur molekular-zytogenetische Kartierung von FRA1K wurden 11 BACs verwendet. Der proximalste Bp wurde durch den BAC RP11-463J7 bestimmt, während RP11-480I12 den am weitesten distal gelegenen Bp der FS kennzeichnet. FRA1K konnte im Bereich von 1q31.2-1q32.1 mit einer Ausdehnung von ca. 12,23 Mbp lokalisiert werden. Das Zentrum der fragilen Region wird durch RP11-258M18 sowie RP11-572A16 begrenzt, liegt im Bereich von 1q31.3-1q32.1 und besitzt eine Größe von ca. 9,75 Mbp. Abbildung 5.23 zeigt die Grenzbereiche sowie das Zentrum der fragilen Region und die relative Lage der grenznahen BACs auf. Tabelle 5.24 gibt die Hybridisierungsergebnisse aller vier FA-Patienten sowie deren Kolokalisation zu FRA1K innerhalb des Materials der Kontrollpersonen wieder. Die darauffolgenden Abbildungen 5.24a-d zeigen Beispiele typischer Hybridisierungen im MMC-behandelten FA-Material sowie im Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen.

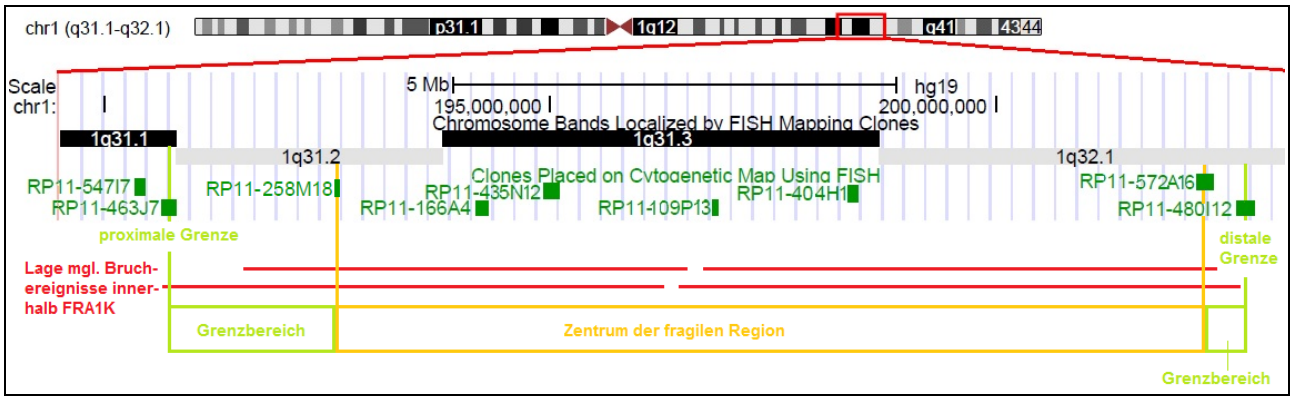


Abb. 5.23: Grafische Darstellung des Zentrums sowie der Grenzbereiche von FRA1K, verändert nach UCSC.

Tab. 5.24: Hybridisierungsergebnisse für die FS FRA1K. Anmerkung: n.g. = nicht geprüft.

BAC	Start (Mbp)	Stop (Mbp)	Lage des BAC zur FS					Kolokalisation
			proximal	prox. Bp	innerhalb	dist. Bp	distal	
RP11-547I7	190.324	190.457	2					n.g.
RP11-463J7	190.628	190.792	1	5				ja
RP11-258M18	192.576	192.624	1	2		2		n.g.
RP11-92K2	192.624	192.752	2	3	3	2		n.g.
RP11-166A4	194.169	194.309						n.g.
RP11-435N12	194.931	195.111		1	1		2	n.g.
RP11-109P13	196.810	196.878		3	3	3	1	n.g.
RP11-404H1	198.339	198.483		2	1	4	1	n.g.
RP11-572A16	202.154	202.329		1	1	3	1	ja
RP11-480I12	202.724	202.859			1	3	5	n.g.
RP11-383G10	205.078	205.256					6	n.g.

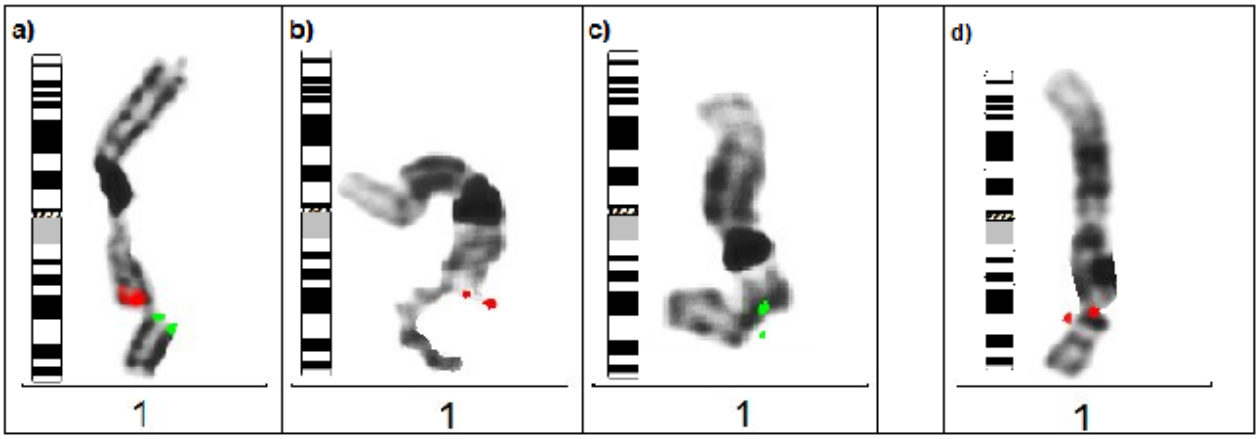


Abb. 5.24a-d Hybridisierungen für FRA1K. a-c = im FA-Material, d = im Material der Kontrollpersonen. a: RP11-547I7 (rot) proximal und RP11-572A16 (grün) dist. Bp, b: RP11-463J7(rot) prox. Bp, c: RP11-92K2 (grün) innerhalb; d: RP11-463J7 (rot) innerhalb des Bruches.

Die Analyse der DNA-Sequenz von FRA1K bezüglich des Flexibilitäts-Peaks, des GC-Gehalts sowie des Gehalts an repetitiven DNA-Motiven erfolgte analog zum Vorgehen bei FRA1B. In Tab. 5.25 werden die Ergebnisse der Untersuchung der einzelnen Abschnitte der FS dargestellt. Die Datenblättern von www.repeatmasker.org der jeweiligen Regionen sind als Abb. 8.7a-c im Anhang zu finden. Eine Übersicht zu den innerhalb der FS gelegenen, ausgewählten Tumor-assoziierten Genen findet sich im Anhang unter Tab. 8.13.

Tab. 5.25: Sequenz- und Flexibilitäts-Analyse der FRA1K.

Region in bp	**GC in%**	**SINEs in%**	**LINEs in%**	**LTR Elemente in%**	**DNA Elemente in%**	**Total interspersed repeats in%**	**Peak der Flexibilität (Anzahl)**
Proximale Grenze: 190 628 094 bis 192 576 285	34,56	6,05	31,06	12,60	3,85	53,64	ja (234)
Zentrum: 192 576 286 bis 202 329 453	38,22	11,45	24,11	8,71	3,69	48,09	ja (696)
Distale Grenze: 202 329 454 bis 202 859 974	43,58	20,58	15,06	2,25	3,02	41,63	ja (9)

6 Diskussion

6.1 Konzeption der Studie

Die vorliegende Studie diente der Etablierung des Modellsystems der Fanconi Anämie zur näheren molekular-zytogenetischen Charakterisierung selten auftretender „Common Fragile Sites“ (CFSs). Die Studie basiert auf der Erkenntnis, dass seltene CFSs bei FA-Patienten häufiger als Bruchereignis im Rahmen zytogenetíscher Untersuchungen beobachtet werden können als in Aph-behandelten Suspensionen Gesunder (Schoder *et al.* 2010). Zur Bearbeitung der Fragestellung wurde Material von zwei klinisch unauffälligen Probanden sowie von vier FA-Patienten verwendet (siehe Tab. 4.1 sowie Tab. 4.2). Die Untersuchungen erfolgten an Suspensionen von Lymphozyten aus Vollblut oder von Lymphoblastoid-Zelllinien, da diese in der Regel besser verfügbar sind als bspw. Suspensionen aus Fibroblasten. Die Verwendung der o.g. Materialien ermöglichte zudem eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zur bisherigen Studienlage, da sowohl CFSs als auch FA-assoziierte Bruchpunkte in erster Linie an Chromosomenpräparationen aus kultivierten Lymphozyten oder Lymphoblastoid-Zelllinien untersucht wurden. Innerhalb einer aktuellen Studie konnten jedoch signifikante Abweichungen der Häufigkeit und der Lokalisation von CFSs in Fibroblasten-Suspensionen im Vergleich zu den aus Untersuchungen von Lymphozyten-Suspensionen bisher ermittelten Daten beobachtet werden (Le Tallec *et al.* 2011). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse der vorliegenden Studie auf andere Zelltypen gilt es dementsprechend in weiterführenden Untersuchungen bspw. an Fibroblasten zu überprüfen.

6.2 Methodische Grundlagen

Im folgenden Abschnitt werden die methodischen Grundlagen der vorliegenden Studie sowie deren Grenzen beurteilt.

6.2.1 Untersuchungsmaterial

Es wurde ausschließlich Material weiblicher Probanden verwendet, da bei diesen für jedes Chromosom ein im gleichen Maße kondensierter Partner in jeder MPP vorlag. Somit wurde gewährleistet, dass auch X-Chromosomen, welche durch Bruchereignisse stärker strukturell gestört waren, zytogenetisch exakt bewertet werden konnten. Alle sechs Probanden sind kaukasischer Abstammung und waren zum Zeitpunkt der Entnahme des Probenmaterials mit Ausnahme von Proband vier junge Erwachsene. Das mittlere Alter der gesunden Probanden beträgt 22,50 Jahre (Standardabweichung: $\sigma \approx 0{,}71$ Jahre), das der von FA betroffenen Probanden 17,00 Jahre ($\sigma \approx$

4,83 Jahre). Die Auswahl der von FA betroffenen Studienteilnehmer erfolgte unter der Maßgabe, die ermittelten Daten auf einen möglichst großen Anteil der FA-Patienten übertragen zu können. Infolgedessen wurde Material der Komplementationsgruppen FA-A und FA-C, also der beiden häufigsten Komplementationsgruppen, verwendet (Alter und Kupfer 2012). Da sowohl *FANCA* als auch *FANCC* für Proteine des „FA core complex“ codieren, beeinflussen sie den „FA-Pathway“ in gleicher Weise und ermöglichen so die Zusammenfassung der Ergebnisse. Diese wird des Weiteren dadurch begünstigt, dass der klinische Verlauf der FA durch den zugrunde liegenden Mutationstyp stärker beeinflusst wird als durch das veränderte Gen (Kalb *et al.* 2007). Innerhalb der vorliegenden Studie wiesen beide Probanden der Komplementationsgruppe FA-C den gleichen Mutationstyp in mindestens einem Allel auf. Für die Probanden der Gruppe FA-A konnte diese Übereinstimmung nicht erreicht werden, da das Mutationsspektrum der FA-A zu groß ist (siehe auch 2.5.2). Die Auswahl der FA-A-Patienten basierte also ausschließlich auf dem gleichen, milden klinischen Verlauf. Da alle vier Probanden einen eher milden Krankheitsverlauf aufwiesen, kann somit die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten gewährleistet werden. Des Weiteren waren beide Komplementationsgruppen durch je eine Lymphoblastoid-Zelllinie sowie eine Suspension aus Vollblut vertreten. Auf diese Weise sollten individuelle Unterschiede des Bruchverhaltens von systematischen Abweichungen, wie bspw. der potentiell erhöhten genetischen Instabilität der Lymphoblastoid-Zelllinien, abgegrenzt werden (Sie *et al.* 2009).

6.2.2 Kulturbedingungen

Die Kultivierung des Materials der sechs Probanden wurde wie unter 4.3 beschrieben durchgeführt. Durch Inkubation der Zellen mit Aph in einer Endkonzentration von 0,2µmol/l wurden FSs induziert. Die Häufigkeit der FSs korreliert mit der Konzentration des Aph im Kulturmedium. Eine Konzentration von 0,2µmol/l Aph erwies sich als vorteilhaft, da chromosomale Bruchereignisse in gesteigerter Häufigkeit auftraten, die zytogenetische Beurteilbarkeit der Metaphasen aber erhalten blieb (Glover *et al.* 1984). Zudem wurden in einer Studie unter niedrigeren Aph-Konzentrationen weniger Mikrodeletionen im Bereich der FSs beobachtet (Durkin *et al.* 2008). Es ist somit anzunehmen, dass sich die verwendete niedrigere Aph-Konzentration eher positiv auf die Präzision der FISH-Untersuchung der FSs auswirkt. Auf eine explizite Überprüfung der bearbeiteten FSs hinsichtlich möglicher Mikrodeletionen wurde jedoch verzichtet.

Die chromosomalen Bruchereignisse innerhalb des FA-Materials wurden durch Inkubation der Zellen mit MMC in einer Endkonzentration von 50ng/ml induziert. Auch die Häufigkeit dieser Bruchereignisse steigt mit der Erhöhung der Konzentration des reaktiven Agens an (Mozdarani *et al.* 2011). Die Wahl der innerhalb der vorliegenden Studie verwendete Konzentration von 50ng/ml

MMC basiert auf den Ergebnissen von Endres. In dessen Arbeit zeigte sich nach MMC-Inkubation in der o.g. Konzentration die optimale Steigerung der Bruchrate, ohne dabei die zytogenetische Beurteilung der Chromosomen gravierend einzuschränken (Endres 2003).
Neben den Aph- und MMC-behandelten Kulturansätzen wurde auch natives Material kultiviert. Die verschiedenen Kulturansätze der einzelnen Probanden wurden dabei allesamt parallel und unter Verwendung der gleichen Chargen der Reagenzien bearbeitet. Somit wurde der Einfluss etwaiger Umweltfaktoren während der Kultivierung bzw. Präparation reduziert.

6.2.3 Zytogenetische Beurteilung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die zytogenetische Beurteilung der Bruchereignisse erfolgte an DAPI-gefärbten Chromosomen. Diese wurden mit Hilfe eines Systems aus Fluoreszenzmikroskop und daran gekoppelter CCD-Kamera digitalisiert und nach Bearbeitung mit der Software ISIS (MetaSystems®) in invertierter Färbung dargestellt. Die DAPI-Färbung beruht auf der Interaktion des Farbstoffes mit AT-reichen DNA-Abschnitten (Kapuscinski 1995). Sie ist einfacher durchführbar als das GTG-Banding und liefert zu diesem Verfahren adäquate Bänderungsmuster (Bayani und Squire 2004). In invertierter Darstellung konnten die DAPI-gefärbten Chromosomen somit mit den auf dem GTG-Banding basierenden Ideogrammen der ISCN ohne gravierenden Informationsverlust verglichen werden. Die Präzision der zytogenetischen Ergebnisse wird demnach in dieser Studie stärker durch den Untersucher sowie durch die physikalisch-technischen Grenzen als durch das angewandte Bänderungsverfahren bestimmt. Um die bestmögliche Exaktheit zu gewährleisten, wurden die vom Autor erfassten Daten von erfahrenen Zytogenetikern überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die physikalisch-technischen Grenzen entziehen sich allerdings einer weiteren Optimierung. Die maximalen Auflösung DAPI-gefärbter Chromosomen unter Verwendung der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie befindet sich zwischen 200nm und 300nm (Belmont *et al.* 1989, Moers *et al.* 1996). Das Auflösungsvermögen wird dabei unter optimalen Rahmenbedingungen (ideale Kombination aus Objektiv und CCD-Kamera, Verwendung idealer Deckgläser, Immersionsöle etc.) im Wesentlichen durch die numerische Aperatur des genutzten Objektivs und die Wellenlänge des vom Fluoreszenzfarbstoff emittierten Lichts begrenzt (Kumar und Zucker 2009). Diese Auflösungsgrenze kann bspw. durch die Verwendung eines 3dSIM-Mikroskopes unterschritten werden, was eine detailliertere Bewertung der Chromosomenstruktur ermöglicht (Carlton 2008). Die Beurteilung chromosomaler Bruchereignisse mit Hilfe der 3dSIM-Mikroskopie steht bisher jedoch aus.

6.2.4 Eignung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von BACs im Rahmen der Fragestellung

Die Arbeitsgruppe „Tumorgenetik“ des Deutschen Krebsforschungszentrums initiierte 2005 das sog. „Fragilome Project“, um die Rolle von FSs innerhalb menschlicher Erkrankungen zu entschlüsseln (Schwab 2006). Um FSs molekular, also auf der Ebene der DNA-Sequenz, zu charakterisieren, erwies sich die Kombination aus FISH von BACs und DNA-Datenbank-Analysen als praktikabel (Eggert und Schwab 2007). Mehrere Studien der o.g. Arbeitsgruppe konnten die Effizienz des Verfahrens belegen (u.a. Hormozian *et al.* 2007, Sawińska *et al.* 2007, Blumrich *et al.* 2011). Diese Methode zur molekular-zytogenetischen Charakterisierung von FSs wurde bisher nur modellhaft auf FA-assoziierte Bruchereignisse angewandt (Schoder *et al.* 2010). Die vorliegende Studie nutzt das beschriebene Verfahren zur Kartierung selten auftretender CFSs in FA-Material. Dabei wurde die FISH von BACs in geringfügig veränderter Form nach Liehr durchgeführt (Liehr 2009). Das Verfahren wurde hinsichtlich der Fixierung der Chromosomen sowie der Denaturierung der Ziel-DNA bedarfsgerecht angepasst (siehe 4.7.2.1 und 4.7.2.2). Wurden OTs mit fragilen Chromosomen, also OTs mit getropften MMC-behandelten Suspensionen der FA-Patienten bzw. mit getropften Aph-behandeltem Material, verwendet, so ging der Pepsinbehandlung der OTs eine Fixierung der Chromosomen voraus. Auf diese Weise wurde die chromosomale Struktur stabilisiert und die Qualität der Bänderung erhöht (Liehr *et al.* 2001). Um die OTs für mehrmalige Hybridisierungen nutzen zu können, musste die Dauer der Denaturierung ausgedehnt werden. Dies gewährleistete die Ablösung der bei der vorausgehenden Hybridisierung genutzten BAC-Sonden und steigerte die Effizienz des Verfahrens (Müller *et al.* 2002).

Die Präzision der durch die FISH erzielten Ergebnisse ist allerdings methodisch bedingt eingeschränkt. So beeinflusst u.a. die Ausdehnung der zu kartierenden CFSs die Genauigkeit des Verfahrens. Die Größe von CFSs variiert zwischen unter 1 Mbp und über 10 Mbp (McAvoy *et al.* 2007). Daher besteht eine gewisse Variabilität der Lage des Bruchereignisses innerhalb des fragilen Bereiches. Während die Bearbeitung von FSs mit einer Ausdehnung von wenigen 100kbp recht eindeutige Hybridisierungsergebnisse liefert, kann die Lage der eingesetzten BACs zum Bruchpunkt schon bei etwas größeren FSs deutlich variieren (Limongi *et al.* 2003, Hormozian *et al.* 2007). Aufgrund dessen sind mehrmalige Hybridisierungen der jeweiligen BAC-Sonde zur korrekten Interpretation deren Lage notwendig. Die angewandte Erweiterung der bisher zur Beurteilung der Hybridisierungen verwendeten Kategorien erhöht das Auflösungsvermögen der Ergebnisse. So wurde die Lage des BAC zum Bruchereignis als proximal, als an der proximalen Grenze, als innerhalb, als an der distalen Grenze oder als distal des Bruchpunktes bewertet, statt die üblichen drei Kategorien (proximal, innerhalb, distal) anzuwenden. Teilt sich ein BAC-Signal in einen vom Bruchpunkt proximalen und einen distalen Anteil auf („Splitting“ des Signals), so

spiegelt er mit seiner DNA-Sequenz die vom Bruchereignis betroffene Sequenz wider. Infolgedessen üben sowohl die Größe der verwendeten BACs als auch deren Kartierung innerhalb der DNA-Datenbanken einen Einfluss auf das Auflösungsvermögen der Methode aus. Die Größe der in dieser Studie genutzten BACs beträgt ca. zwischen 10kbp und 200kbp. Bei der Bearbeitung von FSs einer größeren Ausdehnung begrenzt dies das Aufkommen des Signal-Splittings. Die DNA-Sequenz der FSs kann daher nur indirekt über die Sequenzen aller innerhalb der FS liegenden BACs bis hin zu denjenigen im proximalen und distalen Grenzbereich beurteilt werden. Die Verwendung kleinerer DNA-Sonden (bspw. Cosmide), vor allem für die Bestimmung der Grenzen des Bruchpunktes, würde zwar die Daten zur Ausdehnung der FS präzisieren, aber auch den Aufwand des Verfahrens erheblich steigern. Sie ist daher weniger praktikabel und wird eher zur Beurteilung der Lage spezifischer Genanteile innerhalb FSs genutzt (Zimonjic *et al.* 1997).

Während der DNA-Datenbank-Analyse fielen für einige BACs abweichende Kartierungsergebnisse innerhalb der verschiedenen Online-Datenbanken auf. Ein Beispiel hierfür ist der BAC RP11-353N4. Dieser kartiert im „NCBI-Mapviewer“ (Version 37) zwischen 149.588.675bp und 149.709.840bp während der „UCSC-Genome-Browser“ (Version 37) die Lokalisation des BAC zwischen 149.586.675bp und 149.711.790bp angibt. Hierdurch können die Ergebnisse der molekular-zytogenetischen Charakterisierung der FSs variieren. Um diese Variation zu begrenzen, wurde die Auswertung der kartierten BACs im Regelfall mit Hilfe des NCBI-Mapviewer vorgenommen.

6.2.5 Voraussetzungen und Grenzen der statistischen Beurteilung

Die statistischen Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung mathematischer Regelwerke sowie der Biometrie-Vorlesung des IMSID Jena (Schlittgen 1990, Bartsch 2007, Leistritz 2008). Die Voraussetzungen der Reproduzierbarkeit sowie der Unabhängigkeit der den Daten zugrunde liegenden Versuche sind gewährleistet. Aufgrund der Beschaffenheit der erhobenen Daten ist die Aussagefähigkeit der Statistik allerdings teilweise begrenzt. Im folgenden Abschnitt werden diese Grenzen diskutiert.

Die Aussagekraft der statistischen Daten der vorliegenden Studie wird im Wesentlichen durch die Anzahl der Probanden, den Charakter der beurteilten Merkmale sowie die Anzahl der Messungen bestimmt. Die Auswahl von vier FA-Patienten und zwei Kontrollpersonen entspricht kleinen Stichproben der beiden Grundgesamtheiten. Die Arbeit mit kleinen Stichproben begrenzt zwar die statistische Übertragbarkeit, ist aber im Rahmen der vorliegenden Pilotstudie zur Etablierung einer Untersuchungsmethode geeignet. Innerhalb der Studie werden die beobachteten Chromatidbrüche als zu beurteilenden Merkmale gewertet. Es handelt sich also um metrische, diskrete Merkmale. Je

Proband wurde mindestens 100 Messungen (Anzahl der untersuchten MPP) dieser Merkmale unter je drei verschiedenen Bedingungen vorgenommen. Diese Anzahl wurde willkürlich festgelegt, um eine im Aufwand angemessene Randomisierung zu erreichen. Aufgrund dessen erfolgten die Messungen weitestgehend unabhängig von Bruchanzahl und Bandenstadium. Es wurde lediglich auf ein Bandenstadium zwischen 300 und 550 Banden pro haploiden Chromosomensatz Wert gelegt. Eine darüber hinausgehende gezielte Auswahl der MPP wurde vermieden. Waren die Chromosomen einer MPP aber strukturell so stark beeinträchtigt, dass eine präzise zytogenetische Beurteilung nicht mehr möglich war (siehe Abb. 6.1), musste die jeweilige MPP vernachlässigt werden. Dies trat ausgesprochen selten auf, bedingt aber dennoch eine geringfügige statistische Verzerrung zu Gunsten niedrigerer Bruchraten und Bruchpunkt-Häufigkeiten.

Abb. 6.1: Beispiel einer nicht auswertbaren MPP.

Das mittlere Bandenstadium aller untersuchten MPP beträgt rund 400 Banden pro haploiden Chromosomensatz. Auf eine weitere, auf das Bandenstadium bezogene Analyse der Bruchereignisse wurde verzichtet, da sowohl für Aph-induzierbare FSs als auch für MMC-induzierbare FA-assoziierte Bruchereignisse eine Korrelation zwischen Bruchrate und Bandenstadium nachgewiesen werden konnte (Mrasek *et al.* 2010, Schoder *et al.* 2010). Die zur Beurteilung der einzelnen Ergebnisse genutzten statistischen Testverfahren werden an der Stelle ihrer Anwendung aufgeführt.

6.3 Beurteilung der Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der statistischen Auswertung sowie der molekular-zytogenetischen Charakterisierung der FSs diskutiert.

6.3.1 Statistische Ergebnisse

6.3.1.1 Bruchraten

Im Abschnitt 5.1.1 werden die aus dem erhobenen Datensatz ermittelten Bruchraten beschrieben. Es wurden die spontanen Bruchraten sowie die Bruchraten nach MMC- bzw. Aph-Inkubation der einzelnen Probanden errechnet und die entsprechenden Mittelwerte der beiden unterschiedlichen

Probandengruppen (FA-Patienten bzw. Gesunde) für jede Testreihe gebildet. Unter der Annahme, dass die Bruchraten der Individuen der beiden Grundgesamtheiten (gesunde Bevölkerung und von FA betroffener Bevölkerungsanteil) normalverteilt sind, jedoch unterschiedliche Standardabweichungen aufweisen, kann mit Hilfe des Welch-Tests die Signifikanz der Unterschiede der jeweiligen Gruppen-spezifischen Mittelwerte überprüft werden. Die Berechnungen erfolgten unter Annahme der für medizinische Studien üblichen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

6.3.1.1.1 Spontane Bruchraten

Mit Hilfe der unter Tabelle 6.1 beschriebenen Daten konnte der Unterschied zwischen den mittleren spontanen Bruchrate des Materials der Kontrollpersonen und der FA-Patienten bewertet werden. Der Term t(95%;1) bzw. t(95%;3) entspricht dabei dem tabellierten t-Wert für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bei einem bzw. drei Freiheitsgraden.

Tab. 6.1: Daten des Welch-Tests für die Beurteilung der Signifikanz der spontanen Bruchraten.

Statistische Werte	**Kontrollpersonen**	**FA-Patienten**	**Welch-Test**
Mittelwert der Bruchrate	0,02000	0,10750	/
Standardabweichung (σ)	0,00000	0,06702	/
σ, gewichtet	/	/	0,03351
Approximierte Freiheitsgrade	/	/	3,00000
Prüfwert t	/	/	2,61116
t(95%;3)	/	/	2,35300
t >t(95%;3)	/	/	erfüllt

Tabelle 6.1 ist entnehmbar, dass die verwendeten FA-Suspensionen eine signifikant höhere mittlere spontane Bruchrate als die Suspensionen der Kontrollpersonen aufweisen. Zudem zeigt das verwendete FA-Material im Durchschnitt etwas niedrigere Bruchraten als die in vergleichbaren Studien publizierten Daten, was auf individuelle Schwankungen hinweist (Castella *et al.* 2011a).

6.3.1.1.2 Bruchraten MMC-inkubierter Suspensionen

Tab. 6.2 gibt die Beurteilung der Signifikanz der unterschiedlichen mittleren Bruchraten im MMC-behandelten Material der beiden Probandengruppen wieder. Auch hier zeigt sich, dass die MMC-inkubierten FA-Supensionen eine signifikant höhere mittlere Bruchrate als die entsprechenden Suspensionen der Kontrollpersonen aufweisen. Dies bestätigt die aus der Literatur bekannte, signifikant erhöhte Sensitivität der FA-Suspensionen gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen für die ausgewählten von FA betroffenen Probanden (Sasaki und Tonomura 1973).

Tab. 6.2: Daten des Welch-Tests für die Beurteilung der Signifikanz der MMC-abhängigen Bruchraten.

Statistische Werte	Kontrollpersonen	FA-Patienten	Welch-Test
Mittelwert der Bruchrate	0,57500	9,55000	/
Standardabweichung (σ)	0,00707	3,94369	/
σ, gewichtet	/	/	1,97185
Approximierte Freiheitsgrade	/	/	3,00004
Prüfwert t	/	/	4,55156
t(95%;3)	/	/	2,35300
t >t(95%;3)	/	/	erfüllt

Die vergleichsweise große Standardabweichung der Bruchraten des FA-Materials beruht auf der individuellen Sensibilität der kultivierten Zellen sowie auf dem möglicherweise attenuierten Phänotyp des FA-Patienten 3 (siehe 6.3.2.2; Castella *et al.* 2011a, Ceccaldi *et al.* 2011). Zudem weisen die Kulturen, welche aus Vollblut angelegt wurden, höhere Bruchraten auf. Dies könnte auf die kürzlich beschriebene Resistenz der Lymphoblastoid-Zelllinien gegenüber reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) zurück zu führen sein, da MMC die Integrität der DNA zum einen über die Bildung von „Interstrand Crosslinks“ (ICL), zum anderen über die Generierung von ROS beeinträchtigt (Volpato und Phillips 2007, Cuccarolo *et al.* 2012). ROS-abhängige DNA-Schäden wären dementsprechend in den Vollblut-Kulturen stärker vertreten als im Material der Zelllinien.

6.3.1.1.3 Bruchraten Aph-inkubierter Suspensionen

Die unterschiedlichen Mittelwerte der Aph-behandelten Suspensionen der beiden Probandengruppen wurden ebenfalls mittels Welch-Test auf Signifikanz überprüft. Die Bruchrate des FA-Patienten 3 wich allerdings stark von den Ergebnissen der übrigen FA-Patienten ab, sodass sie bei der Mittelwertberechnung des FA-Materials vernachlässigt wurde, um die Beurteilung der Signifikanz nicht zu beeinträchtigen. Die Abweichung kann durch den möglicherweise attenuierten Phänotyp des Probanden begründet werden, dessen Charakteristik unter 6.3.2.2 aufgeführt ist.

Tab. 6.3: Daten des Welch-Tests für die Beurteilung der Signifikanz der Aph-abhängigen Bruchraten.

Statistische Werte	Kontrollpersonen	FA-Patienten	Welch-Test
Mittelwert der Bruchrate	2,13500	0,15667	/
Standardabweichung (σ)	0,10607	0,08327	/
σ, gewichtet	/	/	0,08578
Approximierte Freiheitsgrade	/	/	1,65875
Prüfwert t	/	/	-23,06028
t(95%;1)	/	/	6,31400
t < -t(95%;1)	/	/	erfüllt

Unter Vernachlässigung der Ergebnisse des FA-Patienten 3 zeigen die Daten aus Tabelle 6.3, dass das Aph-inkubierte Material der Kontrollpersonen eine signifikant höhere Bruchrate als das der FA-Patienten aufweist. Während bei den Kontrollpersonen die mittleren Bruchrate des Aph-behandelten Materials mehr als 100mal größer als deren mittlere spontane Bruchrate ist, ist bei den FA-Patienten lediglich eine Steigerung der mittleren Bruchrate um den Faktor 1,46 nach Aph-Inkubation zu verzeichnen. Der stärkere Effekt von Aph auf die Bruchraten der Kontrollpersonen im Vergleich zu den Bruchraten von FA-Patienten wurde bereits 1985 beschrieben (Porfirio *et al.* 1985). Im Gegensatz zu den Daten der vorliegenden Studie war jedoch die von Porfirio *et al.* ermittelte absolute Bruchanzahl nach Aph-Inkubation bei FA-Patienten größer als bei Kontrollpersonen. Dies kann auf die unterschiedlichen, zur Aph-Lösung verwendeten Chemikalien zurückgeführt werden. Während für die Verwendung von DMSO bei der Kultivierung eukaryotischer Zellen keine genotoxische Wirkung nachgewiesen wurde, kann das in der Studie von Porfirio *et al.* verwendete Propylenglykol chromosomale Schäden induzieren (Aye *et al.* 2010). Aufgrund des der FA zugrunde liegenden DNA-Reparaturdefektes ist davon auszugehen, dass die Verwendung dieser Chemikalie zu den erhöhten absoluten Bruchzahlen der FA-Patienten der Vergleichsstudie beigetragen hat. Das Material der FA-Patienten der vorliegenden Studie zeigt mit Ausnahme von FA-Patient 3 niedrigere Bruchraten nach Aph-bedingtem Replikationsstress als das der Kontrollpersonen. Unter Abschnitt 6.4 werden die Hintergründe der CFSs-Expression bei den FA-Patienten beschrieben werden.

6.3.1.2 Beurteilung der Expressionsraten und Lokalisation FA-assoziierter Bruchereignisse und FSs

Die Beurteilung der Expressionsraten von FA-assoziierten Bruchereignissen und FSs wird in Tabelle 6.4 anhand ausgewählter Bruchpunkte veranschaulicht. Als Referenzstudien wurden die Publikationen von Schoder und Mrasek *et al.* genutzt (Schoder 2009, Mrasek *et al.* 2010). Weitere zytogenetische Studien, v.a. des MMC-behandelten FA-Materials, sind bisher nicht verfügbar. Tabelle 6.4 zeigt Abweichungen der in der vorliegenden Studie ermittelten Expressionsraten sowohl für Bruchereignisse innerhalb der MMC-inkubierten FA-Suspensionen als auch innerhalb des Aph-behandelten Materials der Kontrollpersonen von den jeweiligen Referenzdaten. Diese Diskrepanz kann zum einen auf der bekannten inter-individuellen Variabilität der Expressionsraten und zum anderen auf den abweichenden Stichprobenumfängen beruhen (Mrasek *et al.* 2010, Greenbaum *et al.* 1997). So wurden in dieser Studie 4184 FA-assoziierte Bruchereignisse bewertet, während die Referenzpublikation auf der Analyse von 436 derartigen Brüchen beruht (Schoder 2009). Ähnliches gilt für die 435 Aph-bedingten Bruchereignisse im Material der Kontrollpersonen der vorliegenden Arbeit, welchen eine Untersuchung von 22537 Brüchen gegenüber steht (Mrasek *et al.* 2010).

Tab. 6.4: Übersicht über die durchschnittliche Häufigkeit ausgewählter, kolokaliserender Bruchereignisse in MMC-behandelten FA-Material (MMC-Material) und Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen (Aph-Material) unter Angabe der Bandengröße des haploiden Karyotyps sowie der chromatischen Eigenschaft der jeweiligen Bande und Vergleich zu den Daten der Referenzstudien von Schoder und Mrasek *et al.* (Schoder 2009, Mrasek *et al.* 2010). Anmerkung: k.A. = keine Angabe.

Zytogenet. Lage	**Fragile Site**	**Chromat. Bandentyp**	**Bandengröße in Mbp**	**Anteil in MMC-Material**		**Anteil in Aph-Material**	
				diese Studie	**Schoder 09**	**diese Studie**	**M. *et al.* 10**
1p32	FRA1B	hell	10,6	0,88%	k.A.	0,23%	1,491%
1p22	FRA1D	hell	9,8	0,55%	≈ 4%	1,61%	0,009%
1p21	FRA1E	dunkel	12,5	0,10%	≈ 5%	0,46%	3,400%
1q21	FRA1F	hell	12,4	1,58%	k.A.	0,23%	0,098%
1q25	FRA1G	hell	12,9	0,72%	k.A.	0,46%	0,799%
1q31	FRA1K	dunkel	12,9	0,31%	k.A.	0,23%	0,138%
3p14(.2)	FRA3B	hell	15,4	0,38%	≈ 1%	15,63%	14,153%
16q23	FRA16D	dunkel	10,1	0,24%	≈ 1%	11,49%	7,576%

Die Mehrheit der Bruchereignisse (75% im FA-Material und 80% in Kontroll-Suspensionen) war in hellen Banden lokalisiert. Die vorwiegende Expression von Chromatidbrüchen in hellen Banden wurde sowohl in Aph-inkubiertem Material gesunder Probanden als auch in nativen FA-Suspensionen beobachtet und scheint eine charakteristische Eigenschaft der jeweiligen fragilen Bereiche zu sein (von Koskull und Aula 1973, Mrasek *et al.* 2010). Auffallend ist, dass im MMC-inkubierten FA-Material dieser Studie Bruchereignisse in 356 differenzierbaren Banden auftraten, während das Aph-behandelte Material gesunder, weiblicher Probanden der Referenzpublikation 226 verschiedene Bp (FSs) aufwies (Mrasek *et al.* 2010). Ein pauschales Gleichsetzen von FA-assoziierten Brüchen und FSs ist also nicht möglich.

6.3.1.3 Beurteilung der zytogenetischen Kolokalisation FA-assoziierter Bruchereignisse zu FSs

In Abbildung 5.6 wird die zytogenetische Kolokalisation der chromosomalen Bruchereignisse aller vier untersuchten FA-Patienten zu FSs, welche in der Studie von Mrasek *et al.* als solche definiert wurden, beschrieben (Mrasek *et al.* 2010). Insgesamt kolokalisierten 62,17% aller im MMC-behandelten FA-Material beobachteten Chromatidbrüche zu FSs. In der Vergleichspublikation von Schoder *et al.* trat eine Kolokalisation zu FSs bei 50,58% der FA-assoziierten Bruchereignisse auf (Schoder *et al.* 2010). Die Abweichung der Ergebnisse beruht vermutlich auf den in der vorliegenden Studie berücksichtigten 61 FSs, welche von Mrasek *et al.* erstmals beschrieben wurden (Mrasek *et al.* 2010). Diese FSs wurden in der Arbeit von Schoder, welcher die FSs-Angaben von Lukusa und Fryns 2008 zugrunde lagen, vernachlässigt (Lukusa und Fryns 2008, Schoder 2009). In Abschnitt 5.1.2.3.2 wird auch die potentielle Kolokalisation von

Bruchereignissen eines niedrigeren Bandenstadiums zu FSs beschrieben, welche in höheren Bandenstadien beobachtet wurden. Unter Einbezug dieser Bruchereignis kolokalisieren bis zu 83,34% der Chromatidbrüche des MMC-behandelten FA-Materials dieser Arbeit mit FSs. Gegenwärtig ist die Berücksichtigung der potentiell kolokalisierenden Bruchereignisse jedoch rein spekulativ und wird daher nicht empfohlen. Es bedarf weiterer Studien an MPP eines höheren durchschnittlichen Bandenstadiums, um deren zytogenetische Lage und mögliche Kolokalisation zu FSs zweifelsfrei zu beurteilen.

6.3.1.4 Fragilitätsmaße

Die Beurteilung der Fragilität kann zum einen in Bezug auf einzelne chromosomale Banden und zum anderen in Bezug auf ganze Chromosomen erfolgen.

Die Fragilität einzelner Banden wurde in Analogie zu der von Helmrich publizierten Vorgehensweise mittels BINOMVERT-Funktion von Microsoft Excel® vorgenommen (Helmrich 2005). Hierbei werden folgende Formeln genutzt:

$$Pi=\sum_{i=k}^{n}\binom{n}{i}p^i(1-p)^{n-i} \quad , \quad Pd=\sum_{i=0}^{k}\binom{n}{i}p^i(1-p)^{n-i} \quad .$$

Tabelle 6.5 gibt die Bedeutung der in dieser Formel verwendeten Zeichen in Übersicht wieder.

Tab. 6.5: Übersicht über die in der BINOMVERT-Funktion verarbeiteten Formelzeichen und deren Bedeutung.

Formelzeichen	**Bedeutung und Berechnung**	
Pi	P-Wert für Erhöhte CFS-Expression (aus Helmrich 2005)	
n	Anzahl der unabhängigen Versuche (2 x Anzahl der untersuchten MPP der Suspension)	
k	Anzahl der Chromatidbrüche innerhalb der untersuchten Bande für die jeweilige Suspension (Bruchsumme)	
p	Bruchwahrscheinlichkeit der untersuchten Bande, $p=\frac{e}{n}$, dabei gilt:	
	e	Erwartungswert der Bruchsumme für die jeweilige Bande unter der Annahme von Gleichverteilung, $e=\frac{g*B}{G}$. Anmerkung: g: Größe der betrachteten Bande (in Mbp); G: Größe des Genoms (in Mbp); B: Summe aller in einer Suspension beobachteten Brüche.

In Microsoft Excel® werden die oben genannten Formeln mit Hilfe der folgenden Befehle verarbeitet: Pi=1-BINOMVERT(k;n;p;1)+BINOMVERT(k;n;p;0), Pd=BINOMVERT(k;n;p;1). Unterschreiten die berechneten Pi- bzw. Pd-Werte 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%), so wird die jeweilige Bande als fragil bzw. stabil eingestuft und davon ausgegangen, dass die Abweichung der Bruchsumme von ihrem Erwartungswert e kein Zufallsereignis mehr ist. Werden

insgesamt N Banden auf Fragilität bzw. Stabilität untersucht, muss der Grenzwert für Pi bzw. Pd nach Bonferroni angepasst werden (Helmrich 2005). Somit gilt:

$$Pi\ bzw.\ Pd \leqslant \frac{0.05}{N} \quad .$$

Die Tabelle 8.14 des Anhang gibt eine Übersicht zur Fragilität bzw. Stabilität der einzelnen Banden innerhalb der MMC-behandelten FA-Suspensionen. Nach der Bonferroni-Korrektur wiesen die Chromosomen von drei FA-Suspensionen je zehn und die des übrigen FA-Patienten sechs besonders fragile Bereiche auf. Das angewandte Korrekturverfahren ist allerdings konservativ. Eine weitere Steigerung des Stichprobenumfangs führt daher möglicherweise zu einer erhöhte Anzahl fragiler Bereiche. Dies sollte überprüft werden. Da die untersuchte Stichprobe der Aph-behandelten Suspensionen der Kontrollpersonen (Zahl der beobachteten Chromatidbrüche) eher die untere Grenze des für diese Studien empfohlenen Stichprobenumfangs repräsentiert, wurde auf die oben beschriebene Beurteilung diese Materials verzichtet (Greenbaum *et al.* 1997). Die Bewertung der Stabilität der einzelnen Banden erfolgte unter Vernachlässigung der Bonferroni-Korrektur, da diese Hypothese einen deutlich größeren Stichprobenumfang erfordert (Tab. 8.14). Die Mehrheit der chromosomalen Banden gilt nach o.g. Beurteilung als durchschnittlich fragil bzw. stabil.

Zur Beurteilung der Fragilität ganzer Chromosomen eignet sich der Vergleich des durchschnittlichen Abstands zwischen ihren differenzierbaren Bruchpunkten (siehe Tab. 5.7). Unter dieser Betrachtungsweise gilt das Chromosom 13 als das stabilste und das Chromosom 19 als das fragilstes Chromosom der MMC-behandelten FA-Suspensionen. Im Aph-behandelten Material der Kontrollpersonen dieser Studie wäre dementsprechend das Chromosom 21 als besonders stabil und das Chromosom 6 als besonders fragil zu bewerten. Das Ergebnis der Aph-inkubierten Suspensionen der Kontrollpersonen weicht allerdings von der gegenwärtig Studienlage, die das Chromosom 16 als besonders fragil und die Chromosomen 22 und Y als besonders stabil beschreibt, ab (Mrasek *et al.* 2010). Die Diskrepanz der Daten ist möglicherweise Resultat der stark differierenden Stichprobengröße (435:22537 beobachtete Bruchereignisse im Aph-behandelten Material gesunder Probanden) (Mrasek *et al.* 2010).

6.3.1.5 Beurteilung der in MMC-behandelten FA-Material beobachteten Reunionsfiguren

Innerhalb der vorliegende Arbeit wurden in MMC-behandelten Suspensionen von vier FA-Patienten 557 Reunionsfiguren (rb) beobachtet. Der Vergleich der erhobenen Daten mit einer 2004 publizierten Studie zeigt jedoch zum Teil kontroverse Ergebnisse (Newell *et al.* 2004). So wird keine der sechs am häufigsten in rb involvierten Bruchpunkte (siehe Abschnitt 5.1.4.2.1) als besonders häufiges rb-assoziiertes Bruchereignis bei Newell *et al.* beschrieben. Auch rb zwischen

homologen Chromosomen sowie die Beteiligung von Gonosomen an Figuren wurden in der Vergleichspublikation eher selten beobachtet. In der vorliegenden Arbeit war die Assoziation homologer Chromosomen zu rb (zwei Chromosomen 1 innerhalb nicht homologer Bereiche) relativ häufig zu verzeichnen. Zudem waren X-Chromosomen bei allen vier FA-Patienten in rb involviert. Eine mögliche Ursache der Abweichungen könnten die unterschiedlichen Kulturbedingungen darstellen. Während in der vorliegenden Arbeit die FA-Suspensionen mit 50ng/ml MMC für 48h inkubiert wurden, verwendeten Newell *et al.* bei gleicher Inkubationszeit eine Konzentration von 15-20ng/ml. Ein Einfluss der untersuchten FA-Komplementationsgruppen (FA-A und FA-C in dieser Studie, FA-A und FA-G in der Vergleichspublikation von Newell *et al.*) ist eher unwahrscheinlich, zumal in der vorliegenden Arbeit auch bei Patienten der gleichen Komplementationsgruppe kaum Übereinstimmungen der rb auftraten. Im Einklang mit den Ergebnissen von Newell *et al.* stehen die Beobachtungen, dass die Häufigkeit der Beteiligung von Chromosomen an rb im Wesentlichen proportional zu deren Größe ist und sich zumeist nicht homologe chromosomale Regionen zu rb assoziieren. Letzteres scheint eine Konsequenz des Defektes des FA-Pathway zu sein (Bunting und Nussenzweig 2010). Die Quervernetzung der DNA durch MMC führt zum DNA-Doppelstrangbruch (DSB), dessen Reparatur sowohl durch homologe Rekombination als auch durch „Non-homologous End Joining“ (NHEJ) erfolgen kann (Deans und West 2011). Durch die Aktivität des FA-Pathway wird die DNA-Reparatur mittels homologer Rekombination begünstigt und das Fehler-anfälligere NHEJ verhindert. Ist der FA-Pathway jedoch gestört, werden DSB verstärkt via NHEJ repariert, was die Entstehung von rb zur Folge haben kann (Bunting und Nussenzweig 2010). Auch die Beobachtung, dass Zellen der Komplementations-gruppen FA-A, FA-C und FA-D2 nach Eliminierung des NHEJ gegenüber MMC weniger sensitiv sind, bestärkt diese These (Adamo *et al.* 2010, Pace *et al.* 2010).

6.3.2 Molekular-zytogenetische Ergebnisse

6.3.2.1 Konsequenzen des Karyotyps des FA-Patienten 2

Mit Hilfe der unter 5.2.1.1 erläuterten Untersuchungen konnten der Karyotyp des FA-Patienten 2 als 49, XXX, del(11)(q14;q23.3), +12, +15 charakterisiert werden. Es handelt sich hierbei um eine aberrante Zellpopulation einer Lymphoblastoid-Zelllinie, die bereits 1985 zu Studienzwecken verwendet wurde (Duckworth-Rysiecki *et al.* 1985). Der aberrante Karyotyp der Zelllinie war bisher unbekannt. Es ist davon auszugehen, das aufgrund des Alters der Ausgangskultur die sog. proliferative Krise überschritten wurde und die Zellen einen postimmortalen Zustand erreicht haben. Dies führt u.a. zur Aneuploidie (Sie *et al.* 2009). Zudem erfolgt die Selektion des Zellklons, welcher am besten an die *in vitro* Kulturbedingungen angepasst ist (Sugimoto *et al.* 2004).

Infolgedessen konnten keine weiteren aberrante oder gar euploide Zellklone beobachtet werden. Der selektierte Zellklon beeinflusst die statistische Beurteilung der Bruchereignisse des Probanden. Während die Banden 11q14 bis 11q23.3 in der Analyse unterrepräsentiert sind, sind die Banden der Chromosomen 12, 15 und X relativ überrepräsentiert. Unter diesen Voraussetzungen muss auch die in Tab. 5.5 beschriebene Häufigkeit der Brüche innerhalb der Banden 15q22 und Xq22 als relativ zu hoch betrachtet werden. Die in Tab. 8.14 des Anhangs vorgenommenen Beurteilung der Fragilität der einzelnen Banden erfolgte unter rechnerischer Berücksichtigung der Abberation.

6.3.2.2 Konsequenzen des Karyotyps des FA-Patienten 3

Unter dem Abschnitt 5.2.1.2 wird der Mosaik-Status des FA-Patienten 3 beschrieben. Aufgrund des Nachweises der Trisomie 9 in Lymphozyten und in Zellen der oralen Mukosa des Patienten handelt es sich wahrscheinlich um ein kongenitales Mosaik. Zwar bedingt die vorliegende Grunderkrankung (FA) die genetische Instabilität auch dieser Gewebetypen; das zeitgleiche, voneinander unabhängige Auftreten der gleichen Aberration in zwei Zelltypen ist jedoch eher unwahrscheinlich. Der Phänotyp des Patienten ist sowohl bezüglich der FA als auch der Trisomie 9 eher mild. Der Patient entwickelte sich unauffällig und bisher traten keine FA-typischen Symptome auf. Die Untersuchung bezüglich FA erfolgte aufgrund der Erkrankung eines Geschwisterkindes (persönliche Mitteilung durch Patienten). Allerdings kann die bei dem Patienten vorliegende Trisomie 9 das klinische Bild der FA beeinflussen, da das veränderte Gen *FANCC* in 9q22.3 lokalisiert ist. Hierbei spielt zum einen die Homozygotie für das veränderte *FANCC*-Gen im Rahmen einer uniparentalen Disomie 9 (UPD 9) und zum anderen das potentielle Vorliegen eines Wildtyp-Allels in den trisomen Zellen eine Rolle. Eine UPD 9 ist möglich, falls das zelluläre Mosaik in Folge eines inkompletten „trisomy rescue“ entstanden sein sollte (Robinson 2000). Der unauffällige Phänotyp der Patientin spricht allerdings gegen die UPD (Kotzot und Utermann 2005). Demzufolge wären auch für das Gen *FANCC* ein maternales und ein paternales Allel vorhanden, was die sog. „Compound-Heterozygotie“ begünstigt. Die Compound-Heterozygotie beschreibt das Vorliegen zweier verschiedener Mutationen innerhalb der beiden Allele eines Gens und die mögliche Synthese zweier unterschiedlich veränderter Proteine. Da die „Leiden Open Variation Database“ derzeit Daten zu 56 verschiedene FANCC-Mutationen führt (http://chromium.liacs.nl/LOVD2/FANC/variants.php?action=search_unique&select_db=FANCC, Stand 04/2013) und unter von FA betroffenen Kindern nicht-kosanguiner Eltern die Compound-Heterozygotie sehr häufig ist, ist dieser Status auch für den Probanden wahrscheinlich (Faivre *et al.* 2000). Sowohl die genetische Instabilität der FA-Zellen als auch die Compound-Heterozygotie fördern den „Reversen Mosaizismus“ bei FA-Patienten. Dabei wird bspw. die Rückkehr zu einem

Wildtyp-Allel in einer Zellpopulation über Rückmutationen, intragene Rekombination oder Genkonversion erreicht und der klinische Verlauf gemildert (Gross *et al.* 2002). Die für den FA-Mosaizismus in der Literatur postulierte typische Abgrenzbarkeit zweier gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen unterschiedlich sensibler Zellpopulationen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Oostra *et al.* 2012). Das Vorliegen eines Wildtyp-Allels in den trisomen Zellen kann dadurch allerdings nicht ausgeschlossen werden, da nur MPP euploider Zellen beurteilt werden konnten. Bei einer MMC-Konzentration von 50ng/ml waren dabei keine MPP ohne Bruchereignis zu verzeichnen, während 68% der MPP mehr als zehn Chromatidbrüche aufwiesen (siehe Abb. 5.1). Im Vergleich mit den übrigen drei FA-Patienten der Studie zeigt FA-Patient 3 einen im Mittel mehr als doppelt so großen Anteil an MPP mit mehr als zehn Bruchereignissen nach MMC-Exposition. Dies kann auf einen attenuierten FA-Phänotyp der euploiden Zellen hinweisen. Dieser Phänotyp ist durch einen positiven Chromosomenbruchtest, einen „upstream“ gelegenen Defekt der FA-Proteine sowie einen fehlenden oder signifikant erniedrigten Anteil MMC-induzierter Zellen im G2-Arrest innerhalb des Zellzyklustest gekennzeichnet und eher bei älteren FA-Patienten anzutreffen (Ceccaldi *et al.* 2011). Ceccaldi *et al.* konnten zeigen, dass das Herabregulieren des ATR/CHK1-DNA-Reparaturpfades die genetische Instabilität der FA-Zellen zwar nicht verbessern kann, jedoch durch die daraus resultierende Attenuation des G2-Checkpoints deren Überlebensdauer zu steigern vermag (Ceccaldi *et al.* 2011). Durch diesen Mechanismus umgehen Zellen, deren DNA stärker beschädigt ist, den Zellzyklusarrest, erreichen die Mitose und werden als MPP mit erhöhter Bruchanzahl sichtbar. Auch die deutlich erhöhte Sensibilität der Lymphozyten der Patientin gegenüber den durch Aph-Inkubation erzeugten Replikationsstress kann durch die Herabregulierung des o.g. Reparaturpfades und die Attenuation des G2-Checkpoints erklärt werden. So beeinflusst ATR die Stabilität der FSs über die Aktivierung weiterer Mediatorproteine, welche Franchitto und Pichierri in Übersicht darstellen (Casper *et al.* 2002, Franchitto und Pichierri 2011). Ein wesentlicher Effektor ist dabei CHK1, dessen kritische Rolle in der Regulierung der Stabilität der CFSs bereits nachgewiesen wurde (Durkin *et al.* 2006). Ist die Aktivität des ATR/CHK1-Reparaturpfades eingeschränkt, treten mehr Bruchereignisse an CFSs in den MPP auf. Somit deutet auch die erhöhte Bruchrate im Aph-behandelten Material des FA-Patienten 3 auf das Vorliegen eines attenuierten Phänotyps hin. Dennoch gilt es die Annahme dieses Phänotyps mittels Zellzyklus-Analyse zu verifizieren, da vor allem die Sensitivität gegenüber DNA-quervernetzenden Substanzen zwar mit dem Vorhandensein angeborener Fehlbildungen, jedoch nicht mit dem Alter des Eintretens hämatologischer Erkrankungen korreliert und sich dementsprechend die hohe MMC-bedingte Bruchrate und der milde klinische Verlauf der Patientin nicht prinzipiell ausschließen (Castella *et al.* 2011a, Ceccaldi *et al.* 2011).

6.3.2.3 Charakteristik der kartierten CFSs

Im Rahmen dieser Studie wurden fünf selten auftretende CFSs in MMC-behandeltem FA-Material kartiert und die Übertragbarkeit der ermittelten Daten unter der Verwendung Bruchpunkt-spezifischer BACs an Aph-behandeltem Material von Kontrollpersonen überprüft. Mit Hilfe der bereits kartierten CFS FRA1E konnte die Hypothese der Studie bestätigt werden (Hormozian *et al.* 2007). FRA1E wurde durch Hormozian *et al.* bereits ausführlich analysiert, weshalb diese CFS in den folgenden Betrachtungen vernachlässigt werden kann.

6.3.2.3.1 Ausdehnung und Lage der kartierten CFSs

Die neu kartierten CFSs weisen alle eine Größe von mehreren Mbp auf. Dennoch variieren sie z.T. stark in ihrer Ausdehnung. FRA1D ist 4,98Mbp, FRA1B 7,37Mbp, FRA1F 8,30Mbp, FRA1G 10,65Mbp und FRA1K 12,23Mbp groß. Sie sind in ihrer Ausdehnung allerdings mit anderen kartierten FSs vergleichbar (Zlotorynski *et al.* 2003, Curatolo *et al.* 2007, Fechter *et al.* 2007). Alle fünf in dieser Studie kartierten CFSs zeichnen sich durch einen häufiger von Bruchereignissen betroffenen zentralen Bereich und zwei diesen umgebende Grenzbereiche aus (siehe auch 5.2.2). Die zentralen Bereiche der kartierten CFSs beinhalten Regionen des Übergangs von hellen zu dunklen Banden. Das Zentrum von FRA1B weist drei dieser Übergangsbereiche auf. Die Zentren von FRA1F, FRA1G und FRA1K zeigen jeweils zwei Übergänge von hellen zu dunklen Banden, während FRA1D nur einen derartigen chromosomalen Abschnitt beinhaltet. Diese Übergangsregionen konnten mit unterschiedlichen Replikationszeitpunkten der hellen bzw. dunklen Banden sowie deren enthaltenen Replikationsursprüngen (ORI) in Verbindung gebracht werden und scheinen ein typisches Charakteristikum der CFSs zu sein (Debatisse *et al.* 2006, Watanabe und Maekawa 2013). Auch die Beschreibung der zytogenetischen Lage weiterer 20 FSs in Übergangsbereichen zwischen hellen und dunklen Banden durch Mrasek untermauert die These (Mrasek 2009). Dementsprechend könnten die FSs FRA1B, FRA1F, FRA1G und FRA1K ebenfalls aus mehreren kleineren fragilen Bereichen zusammengesetzt sein. Auch dies wäre nicht ungewöhnlich. So konnte für FRA2C ein Aufbau aus zwei fragilen Regionen nachgewiesen werden (Blumrich *et al.* 2011). Es sind allerdings weitere Untersuchungen nötig, um Ähnliches für die in dieser Studie kartierten FSs zu bestätigen.

6.3.2.3.2 Besonderheiten der DNA-Sequenz der kartierten CFSs

Bisher kartierte CFSs zeichnen sich häufig durch einen relativ hohen AT-Gehalt aus (Lukusa und Fryns 2008). Mit Hilfe des „cross_match“-Suchalgorithmus (Version 1.080812) von www.repeatmasker.org erfolgte unter Abschnitt 5.2.2 die Sequenz-Analyse der in dieser Studie

bearbeiteten CFSs. Für die Beurteilung der DNA-Sequenz der CFSs wird deren mittlerer GC-Gehalt als Durchschnitt aus den Werten des Zentrums der jeweiligen FS sowie den zugehörigen Grenzbereichen ermittelt. FRA1B weist einen mittleren GC-Gehalt von 41,72%, FRA1D von 39,52%, FRA1F von 43,48%, FRA1G von 39,61% und FRA1K von 38,79% auf. Im Vergleich mit dem mittlere GC-Gehalt des humanen Genoms von 41% kann der GC-Gehalt von FRA1D, FRA1G und FRA1K als geringfügig erniedrigt bewertet werden, während FRA1F einen etwas höheren GC-Gehalt zeigt. FRA1B weist einen durchschnittlichen GC-Gehalt auf (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Drei der fünf in dieser Studie neu kartierten CFSs zeigen also einen leicht erhöhten AT-Gehalt. Dennoch scheint dies keine grundlegende Eigenschaft der CFSs zu sein. So zeigten Tsantoulis *et al.*, dass sich CFSs im Durchschnitt eher durch einen erhöhten GC-Gehalt, einer erniedrigten DNA-Flexibilität und einem Reichtum an Alu-Sequenzen auszeichnen (Tsantoulis *et al.* 2008). Die Ergebnisse der DNA-Sequenz-Analyse der in der vorliegenden Studie kartierten FSs bezüglich repetitiver Elemente wird in Abb. 6.2 verglichen. Hierfür wurde der mittlere Gehalt an repetitiven Elemente für jede FS ebenfalls aus den zugehörigen Daten der Zentren und Grenzbereiche gemittelt.

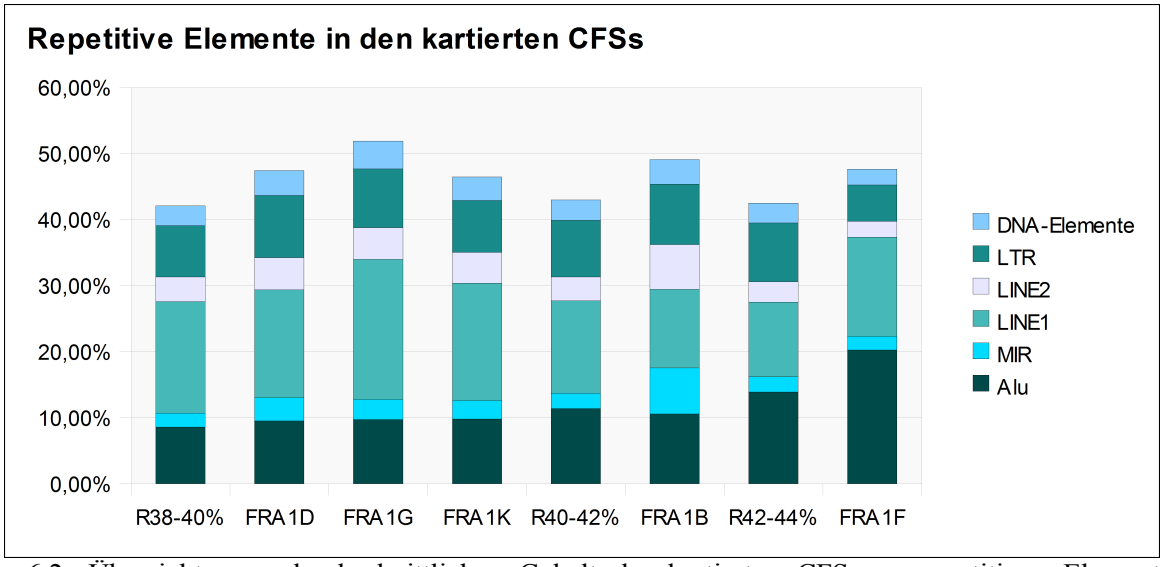


Abb. 6.2: Übersicht zum durchschnittlichen Gehalt der kartierten CFSs an repetitiven Elementen im Vergleich zu Referenzdaten aus Smit 1999. Anmerkung: R38-40%: Referenzdaten für DNA-Sequenzen mit GC-Gehalt von 38-40%; R40-42%: Referenzdaten für DNA-Sequenzen mit GC-Gehalt von 40-42%; R42-44%: Referenzdaten für DNA-Sequenzen mit GC-Gehalt von 42-44%.

Abbildung 6.2 zeigt, dass der Gehalt an repetitiven Elementen zwischen den FSs variiert, aber alle fünf kartierten CFSs einen höheren Gehalt an diesen Elementen als deren zugehörige Referenzregionen aufweisen. Zudem zeigen FRA1D, FRA1G und FRA1K einen leicht und FRA1F einen deutlich erhöhten Gehalt an Alu-Elementen als deren jeweilige Referenzregion. Lediglich FRA1B wies im Vergleich einen relativ geringeren Gehalt an Alu-Elementen. 2011 konnte in einer

genomweiten Studie der erhöhte Gehalt an Alu-Elementen als typisches Charakteristikum der CFSs bestätigt werden (Fungtammasan *et al.* 2012). Dennoch scheint es kein spezifisches Muster der repetitiven Elemente innerhalb CFSs zu geben, was bspw. die Überrepräsentation von MIR Elementen in FRA1B im Vergleich zur Referenzregion und zu den übrigen kartierten CFSs zeigt. Auch die DNA-Flexibilität der CFSs wird kontrovers bewertet. So beschrieben Fungtammasan *et al.* im Gegensatz zu Tsantoulis *et al.* die gesteigerte DNA-Flexibilität als typische CFSs-Eigenschaft (Fungtammasan *et al.* 2012). Die in der vorliegenden Studie kartierten CFSs enthielten alle mehrere Flexibilitäts-Peaks. Tabelle 8.15 zeigt eine Übersicht zur Peak-Anzahl pro Mbp der einzelnen FS. FRA1G und FRA1K weisen dabei die größten relativen Peak-Werte auf. Die durch TwistFlex® errechnete mittlere Flexibilität der FSs beträgt für FRA1B 10,81°, für FRA1D 10,87°, für FRA1F 10,66°, für FRA1G 10,83° und für FRA1K 10,96°. Im Vergleich mit der publizierten mittleren Flexibilität der DNA (10,786°) können diese FSs mit Ausnahme von FRA1F als Bereiche erhöhter Flexibilität beurteilt werden (signifikant; einseitiger Einstichproben-t-Test, $t = 2{,}45 > t(0{,}95;3)$) (Tsantoulis *et al.* 2008).

6.3.2.3.3 Ausgewählte Gene innerhalb der kartierten CFSs – Translokation, Amplifikation, Deletion

Die Tabellen 8.9 bis 8.13 des Anhangs geben einen Überblick über die innerhalb der kartierten CFSs lokalisierten Gene, welche in veränderter Expression in humanen Tumorgewebeproben nachgewiesen werden konnten. Die ermittelten Gene wurden zunächst bezüglich ihrer Größe analysiert, da die Assoziation von FSs zu großen Gene häufig beobachtet wird (Smith *et al.* 2006). Die Transkription großer Gene dauert länger als einen Zellzyklus an. Infolgedessen kommt es zur Kollision zwischen Transkriptions- und Replikationskomplex und zur Formation von „R-Loops“ (RNA-DNA-Hybride), was zur Expression von FSs führt (Helmrich *et al.* 2011). Acht der 113 in den Tabellen 8.9 bis 8.13 aufgeführten Gene wiesen eine Größe über 100 kbp auf. Sechs dieser größeren Gene zeigten eine Lage innerhalb der Zentren der CFSs. Unter diesen sind zum einen das größte der analysierten Gene *DAB1* (Größe: 1,25 Mbp), dessen Lage innerhalb des Zentrum von FRA1B durch die vorliegende Studie konkretisiert werden konnte und zum anderen die beiden nächst kleineren Gene *TNR* (0,42 Mbp) und *COP1* (0,26 Mbp), welche innerhalb des Zentrums von FRA1G lokalisiert sind (McAvoy *et al.* 2008). Zudem wurden die 113 innerhalb der FSs lokalisierten Gene hinsichtlich möglicher Translokationen, Amplifikationen oder Deletionen beurteilt, da derartige Veränderungen häufig im Bereich von FSs in Tumorzellen beobachtet werden (Dillon *et al.* 2010).

Für vier der kartierten CFSs (FRA1B, FRA1D, FRA1F, FRA1G) wurden Bruchereignisse im Rahmen von Translokationen beschrieben (siehe auch Tab. 8.9 bis 8.12). Die Translokationen

wurden in Zellen maligner solider Tumore wie bspw. Sarkomen, in Zellen maligner Systemerkrankungen wie Leukämien und Lymphomen, aber auch in Proben benigner Geschwulste wie Lipomen beobachtet (Tse *et al.* 1995, Nakamura *et al.* 2008, Gatza *et al.* 2010, Bianchini *et al.* 2013). 2009 konnten Burrow *et al.* zeigen, dass 52% der Bruchpunkte, welche in Gen-Paaren Neoplasie-spezifischer rekurrenter Translokationen auftreten, innerhalb FSs liegen (Burrow *et al.* 2009). Die Beschreibung von Translokations-assoziierten Bruchereignissen im Bereich der kartierten CFSs ist dementsprechend nicht ungewöhnlich.

Amplifikationen bzw. Deletionen von Genen wurden mit Ausnahme von FRA1G in allen innerhalb dieser Studie kartierten CFSs beschrieben (Details siehe Tab. 8.9 bis 8.13). Bereits 1997 postulierten Coquelle *et al.* die These, dass FSs eine wesentliche Rolle bei der Amplifikation von Onkogenen über das „Breakage-Fusion-Bridge"-Modell (BFB) spielen (Coquelle *et al.* 1997). 2002 konnte dies am Beispiel des *MET*-Gens verifiziert werden (Hellman *et al.* 2002). Die in den Tabellen 8.9 bis 8.13 als amplifiziert beschriebenen Gene regulieren direkt oder indirekt die Zellproliferation und können somit als Protoonkogene betrachtet werden. Ob deren Amplifikation ebenfall via BFB verläuft und somit von der jeweiligen CFS abhängt, muss noch geklärt werden.

Die Bedeutung von Deletionen, welche an CFSs auftreten, wird kontrovers diskutiert. So beschreiben Lai *et al.* Deletionen im Bereich von FRA3B, welche typischerweise früh in präneoplastischen Läsionen des Ösophagus (Barett Ösophagus) auftreten und auch in Adenokarzinomen des Ösophagus nachweisbar sind (Lai *et al.* 2010). Der aus den Deletionen resultierende Verlust der Expression des *FHIT*-Gens (Tumorsuppressorgen) steigert die genetische Instabilität und trägt somit zur malignen Transformation der Zellen bei (Saldivar *et al.* 2012). Im Gegensatz dazu zeigte die Studie von Dereli-Öz *et al.*, dass die Mehrheit der rekurrenten Deletionen im Bereich von CFSs in Tumorzellen „Passenger Mutationen" sind, welche in Folge des in diesen Zellen bestehenden Replikationsstresses auftreten. Die Deletionen sind somit im Hinblick auf die maligne Transformation eher als Konsequenz denn als Ursache zu betrachten (Dereli-Öz *et al.* 2011). Somit können die in den Tabellen 8.9 bis 8.13 aufgeführten Gene, deren Deletionen in Tumorgewebeproben auftraten, nicht zweifelsfrei als Tumorsuppressorgene beschrieben werden.

6.3.2.3.4 Potentielle klinische Konsequenzen der kartierten CFSs bei FA-Patienten

FA-Patienten weisen ein erhöhtes Risiko für bestimmte maligne Erkrankungen auf. Alter *et al.* konnten zeigen, dass dies v.a. für das Myelodysplastische Syndrom (MDS), für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus und des Kopf- und Halsbereiches (HNSCC) sowie für die Akute Myeloische Leukämie (AML) gilt (Alter *et al.* 2010). Die Übersicht zu Tumor-assoziierten Genen der kartierten CFSs in den Tabellen 8.9 bis 8.13 zeigt, dass innerhalb FRA1F mehrere Gene

lokalisiert sind, welche in oralen Plattenepithelkarzinomen verändert exprimiert werden. Die Gene bilden den sog. „Epidermalen Differenzierungskomplex“ und sind in HNSCC meist herabreguliert (Ginos *et al.* 2004). Obwohl es sich bei FRA1F um einen der fragilsten Bereiche im Material von FA-Patienten handelt (siehe auch Tab. 8.14), steht die Untersuchung dieser Region in FA-HNSCC-Zelllinien oder Tumorgewebeproben von FA-Patienten noch aus (van Zeeburg *et al.* 2008).

Für die AML konnten bereits Abberationen im Bereich der kartierten CFSs beschrieben werden. Es traten u.a. Zugewinne der Bereiche von 1p31.1-1p34.3 und 1q24.3-1q44 auf (Meyer *et al.* 2007). Der Zugewinn im Bereich von 1q wurde in FA-assoziierten AML-Fälle häufig, in der Vergleichsgruppe der *de novo* AML-Fälle aber eher selten beobachtet (Rochowski *et al.* 2012). Diese Diskrepanz deutet darauf hin, dass 1q-Aberrationen eine direkte Folge der durch den gestörten FA-Pathway auftretenden DNA-Schäden sind (Meyer *et al.* 2012). Interessanterweise zeigte sich der Zugewinn von 1q aber auch in morphologisch relativ unauffälligem Knochenmark. Das Auftreten dieser Abberation ist häufig der einzige Befund in Frühstadien der klonalen Evolution innerhalb der hämatologischen Vorläuferzellen und kann über Jahre unverändert fortbestehen (Meyer *et al.* 2012). Es ist daher möglich, dass 1q-lokalisierte Gene eine Rolle bei der malignen Transformation von hämatologischen Vorläuferzellen bei FA-Patienten spielen.

6.4 Hintergrund der Fragilität von CFSs

6.4.1 Modell der CFSs-Expression

Nach Aph-Induktion an humanen Lymphozyten konnten 230 verschiedene FSs beobachtet werden (Mrasek *et al.* 2010). Die variierenden Expressionsraten der einzelnen fragilen Bereiche spiegeln möglicherweise deren individuelle Sensibilität gegenüber Replikationsstress wider. Zwei gegenwärtig verfügbare genomweite Studien zur Charakteristik von CFSs zeigen kontroverse Ergebnisse auf (Tsantoulis *et al.* 2008, Fungtammasan *et al.* 2012). Die Etablierung eines universellen Konzeptes zur CFSs-Expression gestaltet sich dementsprechend schwierig. Unter der Annahme, dass die individuellen Eigenschaften der FSs die Sensibilität gegenüber einer Replikationsverzögerung zwar bedingen, die „gemeinsame Endstrecke“ bis zur Wiederaufnahme des Replikationsvorgangs aber bei allen CFSs ähnlich verläuft, kann das in Abbildung 6.3 beschriebene Modell zur Veranschaulichung der CFSs-Expression genutzt werden. Dieses wurde durch Glover *et al.* etabliert, von Debatisse *et al.* überarbeitet und soll hier kurz dargestellt werden (Glover *et al.* 2005, Debatisse *et al.* 2012).

Die partielle Inhibition der DNA-Polymerasen α, δ und ε durch Aph führt zum Entkoppeln der DNA-Polymerasen vom Helikasekomplex. Dieser Komplex schreitet weiter voran und legt größere Abschnitte Einzelstrang-DNA (ssDNA) frei. Liegen geeignete DNA-Sequenz-Abschnitte als

ssDNA vor, kann es bei bestimmten FSs zur Bildung sekundärer DNA-Strukturen und zum Stillstand der Replikationsgabel kommen. Die Expression andere FSs (darunter FRA3B und FRA16D) erfolgt aufgrund eines Mangels an Replikationsursprüngen (ORI) und der Zelltyp-spezifischen Initiation der Replikation. Der Mangel an ORI führt zu großen Distanzen, welche von den Replikationsgabeln der flankierenden Regionen überwunden werden müssen. Aph beeinträchtigt die Dynamik der DNA-Polymerasen der flankierenden Bereiche. Es ist zu erwarten, dass auch dies freiliegende ssDNA zur Folge hat. Das Replikationsprotein A (RPA) bindet an die ssDNA und aktiviert weitere Checkpoints (Budzowska und Kanaar 2009).

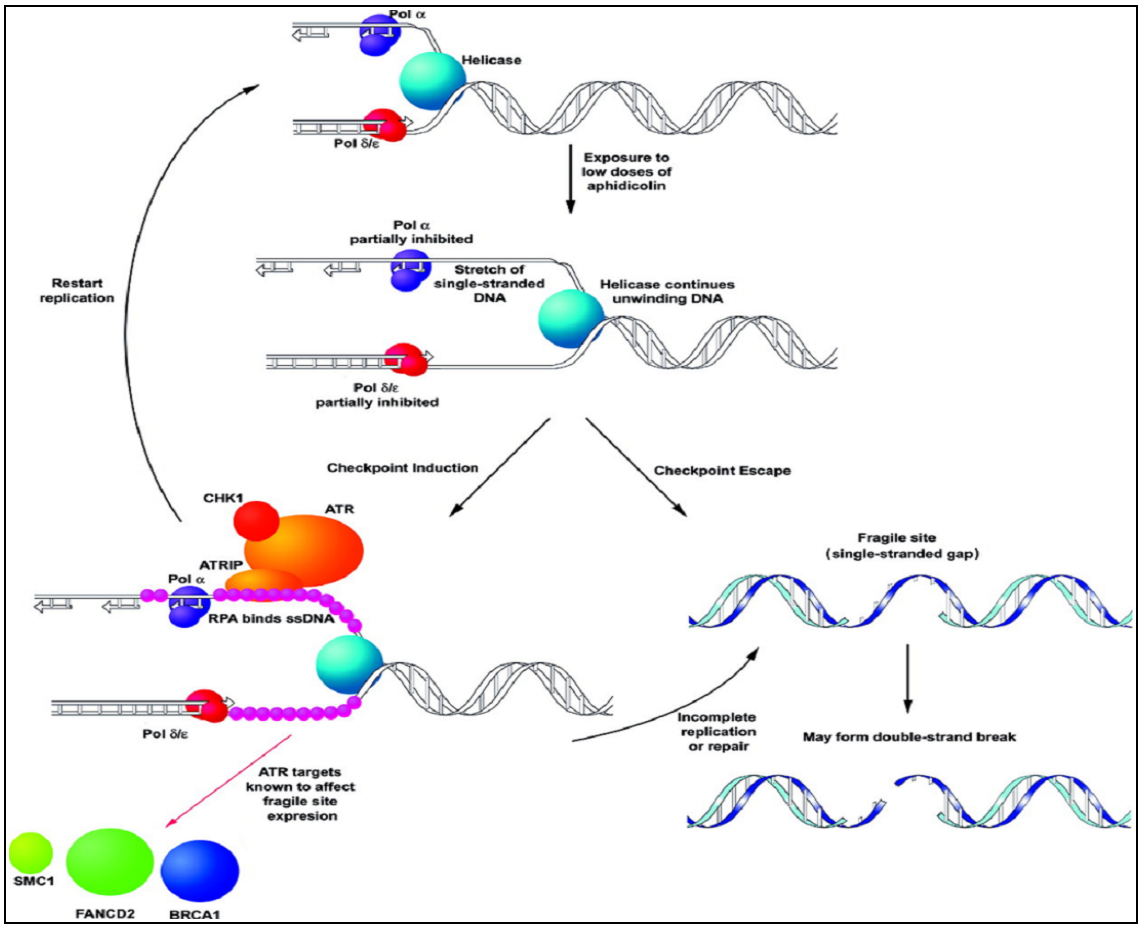


Abb. 6.3: Allgemeines Modell zur CFSs-Expression nach Glover *et al.* 2005.

Im Vordergrund steht hierbei das Heranführen des ATR/ATRIP-Komplexes an den Ort des DNA-Schadens. Ist der ATR/ATRIP-Komplex korrekt lokalisiert, erfolgt die Aktivierung der Proteine RAD17 und Claspin. Das phosphorylierte Claspin interagiert mit CHK1 und ermöglicht so dessen Aktivierung durch ATR. CHK1 stabilisiert daraufhin stillstehenden Replikationsgabeln, aktiviert Intra-S-Phase-Checkpoints und verlängert die Replikationsdauer durch Hemmung spät wirkender ORI (Budzowska und Kanaar 2009). Defizite der CHK1-Funktion sowie der ATR-Funktion führen zur gesteigerten Expression von CFSs (Casper *et al.* 2002, Durkin *et al.* 2006). Unter Replikationsstress interagiert ATR zudem mit weiteren Proteinen, welche u.a. oben genannte

sekundäre DNA-Strukturen beseitigen (BLM, WRN), weitere Checkpoints aktivieren (BRCA1 aktiviert G2/M-Phase-Checkpoint) oder die Reparatur von DNA-Schäden koordinieren (bspw. FANCD2, FANCI, SMC1, RAD51) (Franchitto und Pichierri 2011, Ozeri-Galai *et al.* 2012, Shigechi *et al.* 2012). BRCA1, FANCD2, FANCI und RAD51 sind auch Komponenten des FA-Pathway. Dessen Einfluss auf die CFSs-Stabilität wurde bereits 2005 beschrieben (Howlett *et al.* 2005). Es existieren weitere Schnittstellen zwischen dem beschrieben Modell der CFSs-Expression und dem FA-Pathway. So binden bspw. FANCA, FANCC und FANCG während der ungestörten Replikation an die DNA, während FANCJ die Assoziation von RPA an ssDNA unter Replikationsstress fördert (Wang *et al.* 2008, Flynn und Zou 2011). Zudem konnte für den Komplex aus FANCM und FAAP24 die Aktivierung des ATR-Reparaturpfades in Abhängigkeit von Quervernetzungen der DNA beschrieben werden (Flynn und Zou 2011).

6.4.2 Veränderte Expressionsraten von CFSs in FA-Material

6.4.2.1 Expression von CFSs in MMC-behandelten FA-Material

Die MMC-Inkubation der FA-Zellen erzeugt kovalente Verbindungen zwischen den beiden Strängen der enthaltenen DNA (siehe auch 4.3.1.1). Diese treten aufgrund der molekularen Eigenschaften des bifunktionalen Alkylanz spezifisch innerhalb CpG·CpG DNA-Sequenzen auf (Tomasz 1995). Durch Methylierung der Cytosine innerhalb der CpG-Dinukleotide wird die Selektivität gesteigert (Li *et al.* 2000). Infolge der Quervernetzung der DNA kollabiert die Replikationsgabel und es kommt zum DSB (Wang *et al.* 2008). Die Abweichung der Expressionsraten der CFSs in MMC-behandelten FA-Suspensionen von jenen in Aph-inkubierten Material von Kontrollpersonen sind möglicherweise auf diese Selektivität zurück zu führen. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass in Zellen von FA-Patienten die DNA in Regionen typischer CFSs (bspw. FRA3B und FRA16D) demethyliert vorliegt. Eine selektive Demethylierung der DNA dieser Regionen könnte aufgrund der in ihnen lokalisierten großen Gene bestehen. Diese bedingen das vermehrte Auftreten von R-Loops der DNA (siehe auch 6.3.2.3.3), welche als Signal zur DNA-Demethylierung fungieren (Aguilera und García-Muse 2012). Obwohl ein positiver Einfluss der DNA-Demethylierung auf die Stabilität von CFSs bereits nachgewiesen wurde, hat der oben beschriebene Hintergrund der abweichenden Expressionsraten der CFSs lediglich spekulativen Charakter (Jiang *et al.* 2009). Somit sind weitere Untersuchungen (bspw. der DNA-Methylierung der entsprechenden Regionen im Material von FA-Patienten) notwendig.

6.4.2.2 Sensibilität des FA-Materials gegenüber Aph-bedingten Replikationsstress

Wie unter Abschnitt 6.3.1.1.3 wies das Material von drei der vier untersuchten FA-Patienten eine

geringere Bruchrate nach Aph-Inkubation als das in gleicher Weise behandelte Material der Kontrollpersonen auf. Die geringeren Bruchraten in Aph-behandeltem FA-Material können prinzipiell auf zwei verschiedenen zellulären Mechanismen beruhen. Zum einen ist es möglich, dass der Replikationsstress durch Aph zum Eintritt empfindlicherer Zellen in den G2-Arrest führt und daher weniger MPP mit hoher Bruchanzahl auftreten. Dies könnte bspw. infolge der Aktivierung des ATR/CHK1-Signalwegs und des Abbau der CDC25A-Phosphatase, welcher durch höhere Dosen von Aph getriggert wird, geschehen (Durkin *et al.* 2006).

Zum anderen könnten in FA-Zellen Mechanismen der kompensatorischen Anpassung an Replikationsstress existieren, um die Anzahl replikationsbedingter DSB, deren Reparatur aufgrund des gestörten FA-Pathway schwieriger zu koordinieren wäre, zu minimieren. So wird bspw. die infolge eines FANCD2-Defizits auftretende Instabilität von stillstehenden Replikationsgabeln durch die Aktivität von RAD51 kompensiert (Schlacher *et al.* 2012). Auch ist es denkbar, dass zusätzliche „schlafende“ Replikationsursprünge (sog. „dormant replication origin“) rekrutiert werden. In Zellen, welche ein Defizit der FANCM-Funktion aufweisen, wurde die ATR/PLK1-abhängige Aktivierung derartiger Replikationsursprünge nach Replikationsstress beobachtet (Schwab *et al.* 2010). Es ist möglich, dass auch Zellen anderer FA-Komplementationsgruppen ähnlich auf eine Aph-Inkubation reagieren. Darüber hinaus konnte im Tiermodell die Interaktion zwischen „schlafenden“ Replikationsursprüngen und FA-Proteinen ebenfalls nachgewiesen werden. So zeigten Regionen, welche einen Mangel an rekrutierten „schlafenden“ Replikationsursprüngen aufwiesen, DNA-Foci der FANCI- und FANCD2-Assoziation (Kawabata *et al.* 2011). Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um das Muster der Replikationsursprünge in FA-Material zu charakterisieren und ggf. Abweichungen zu demjenigen gesunder Kontrollpersonen zu beobachten.

6.5 Potentielle Fehlerquellen

Trotz aller Sorgfalt bei der zytogenetischen bzw. molekular-zytogenetischen Bewertung der MPP und der Überprüfung der ermittelten Daten durch erfahrene Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, konnte es zu fehlerhaften Beurteilungen kommen. Dies gilt vor allem für mögliche Verwechslungen von Suspensionen und Objektträgern sowie Chromosomen bzw. deren Banden bei der Aufzeichnung von Bruchereignissen. Auch ist es denkbar, dass Bruchereignisse übersehen oder fälschlicherweise chromosomale Gaps als solche bewertet wurden. Der Einfluss der erhobenen Daten (bspw. durch Vernachlässigung sehr stark geschädigter MPP) auf deren statistische Auswertung wurde bereits beschrieben (siehe 6.2.5). Die molekular-zytogenetischen Ergebnisse konnten zum einen durch die bereits o.g. Fehlerquellen, zum anderen durch Verwechslung der zur Hybridisierung verwendeten Sonden und Fehlinterpretation der Hybridisierungsergebnisse negativ beeinflusst werden.

7 Schlussfolgerungen

Die im Abschnitt 3 (Ziel der Studie) beschriebenen Fragen konnten wie folgt beantwortet werden:

1. Basierend auf einer initialen zytogenetischen Beurteilung von Bruchereignissen des MMC-behandelten FA-Materials und des Aph-behandelten Materials gesunder Kontrollpersonen konnten im Rahmen der vorliegenden Studie selten auftretende CFSs des Chromosoms 1 mittels FISH kartiert werden. Hierzu wurden durch die Hybridisierung Bruchpunkt-spezifischer BACs die Grenzen der CFSs in MMC-inkubierten FA-Suspensionen bestimmt und die Übertragbarkeit der Kartierungsergebnisse auf Aph-behandeltes Material gesunder Probanden überprüft. Mit Hilfe dieser Methode konnte die vorliegenden Pilotstudie die FA als Modellsystem zur Kartierung selten auftretender CFSs etablieren. Die Bearbeitung weiterer selten exprimierter CFSs auf o.g. Weise und in einem größeren Patientenkollektiv sollte sich zur Verifizierung anschließen. Darüber hinaus gilt es, die Methode aufgrund der Zelltyp-Abhängigkeit der FSs-Expression auch in anderen Gewebetypen (bspw. Fibroblasten) zu überprüfen (Le Tallec *et al.* 2011).

2. Die molekular-zytogenetische Kartierung der CFSs ermöglichte die Datenbank-Analyse der jeweiligen chromosomalen Region, um den Gehalt an repetitiven DNA-Elementen, die Flexibilität der DNA und innerhalb der jeweiligen CFS lokalisierte Gene zu bestimmen. Dies kann zur Aufklärung der Ursache der Fragilität beitragen. Es zeigte sich, dass sich die DNA-Sequenz-Abschnitte im Bereich der verschiedenen CFSs bezüglich ihrer repetitiven Elemente und Flexibilität unterscheiden. Somit können diese Eigenschaften zwar zur Fragilität der Region beitragen, diese aber nicht allein bestimmen. Die Stabilität der einzelnen CFSs wird vermutlich eher durch eine für die jeweilige FS spezifische Kombination fragilitätsfördernder Faktoren beeinträchtigt.

3. Die Datenbank-Analyse der neu kartierten CFSs zeigte Hinweise auf deren potentielle Rolle im Rahmen der malignen Karyotyptransformation bestimmter Gewebetypen bei FA-Patienten (6.3.2.3.4). So sind bspw. innerhalb der bei FA-Patienten stark exprimierten FS FRA1F Gene des „Epidermalen Differenzierungskomplexes“ lokalisiert, deren Expression in entsprechenden Tumorgewebeproben (HNSCC) untersucht werden sollte.

4. Durch die der molekular-zytogenetischen Untersuchung vorausgehende zytogenetische Analyse der Bruchereignisse des MMC-behandelten FA-Materials wurden die von Schoder beschriebenen Abweichungen der FSs-Expression auch bei weiteren FA-Patienten beobachtet und lassen so auf eine regelmäßige Diskrepanz schließen (Schoder 2009). Mögliche Hintergründe der abweichenden Expressionsmuster konnten in der vorliegenden Arbeit nur spekulativ aufgegriffen werden (6.4.2). Somit eignen sich Untersuchungen des Methylierungsmusters oder des Replikationsverlaufs (bspw. Zeitpunkt der ORI-Aktivierung) der DNA von FA-Patienten als Gegenstand weiterer Studien.

Literaturverzeichnis

Adamo A, Collis SJ, Adelman CA, Silva N, Horejsi Z, Ward JD, Martinez-Perez E, Boulton SJ, La Volpe A. 2010. Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia. Molecular cell, 39(1):25-35.

Aguilera A, García-Muse T. 2012. R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. Molecular cell, 46(2):115-24.

Ali AM, Kirby M, Jansen M, Lach FP, Schulte J, Singh TR, Batish SD, Auerbach AD, Williams DA, Meetei AR. 2009. Identification and characterization of mutations in FANCL gene: a second case of Fanconi anemia belonging to FA-L complementation group. Human Mutation, 30(7):E761-70.

Alter BP. 2003. Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. Cancer, 97(2):425-40.

Alter BP, Kupfer G. 2012. Fanconi Anemia. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP (eds). GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2002. Feb 14 [updated 2012 Sep 06].

Alter BP, Caruso JP, Drachtman RA, Uchida T, Velagaleti GV, Elghetany MT. 2000. Fanconi anemia: myelodysplasia as a predictor of outcome. Cancer genetics and Cytogenetics, 117(2):125-31.

Alter BP, Rosenberg PS, Brody LC. 2007. Clinical and molecular features associated with biallelic mutations in FANCD1/BRCA2. Journal of Medical Genetics, 44(1):1-9.

Alter BP, Giri N, Savage SA, Peters JA, Loud JT, Leathwood L, Carr AG, Greene MH, Rosenberg PS. 2010. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. British Journal of Haematology, 150:179–88.

Ameziane N, Sie D, Dentro S, Ariyurek Y, Kerkhoven L, Joenje H, Dorsman JC, Ylstra B, Gille JJ, Sistermans EA, de Winter JP. 2012. Diagnosis of fanconi anemia: mutation analysis by next-generation sequencing. Anemia, 2012:132856.

Anderson R. 2010. Multiplex fluorescence in situ hybridization (M-FISH). Methods in Molecular Biology, 659:83-97.

Anderson S. 1981. Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. Nucleic Acids Research, 9(13):3015-27.

Arlt MF, Miller DE, Beer DG, Glover TW. 2002. Molecular characterization of FRAXB and comparative common fragile site instability in cancer cells. Genes, chromosomes & cancer, 33(1):82-92.

Arlt MF, Casper AM, Glover TW. 2003. Common Fragile Sites. Cytogenetic and genome research,

100(1-4):92-100.

Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL, Glover TW. 2006. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. DNA Repair, 5(9-10):1126-35.

Arrighi FE, Hsu TE. 1971. Localisation of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics 10:81-6.

Auerbach AD. 1993. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. Experimental hematology, 21(6):731-3.

Auerbach AD. 2009. Fanconi anemia and its diagnosis. Mutation Research, 668(1-2):4-10.

Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. 2010. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. Food and chemical toxicology, 48(7):1905-12.

Baessler T, Krusch M, Schmiedel BJ, Kloss M, Baltz KM, Wacker A, Schmetzer HM, Salih HR. 2009. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans. Cancer research, 69(3):1037-45.

Balakrishnan A, von Neuhoff N, Rudolph C, Kamphues K, Schraders M, Groenen P, van Krieken JH, Callet-Bauchu E, Schlegelberger B, Steinemann D. 2006. Quantitative microsatellite analysis to delineate the commonly deleted region 1p22.3 in mantle cell lymphomas. Genes, chromosomes & cancer, 45(10):883-92.

Barlow JH, Faryabi RB, Callén E, Wong N, Malhowski A, Chen HT, Gutierrez-Cruz G, Sun HW, McKinnon P, Wright G, Casellas R, Robbiani DF, Staudt L, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A. 2013. Identification of Early Replicating Fragile Sites that Contribute to Genome Instability. Cell, 152(3):620-32.

Bartsch HJ. 2007. Stochastik. In: Taschenbuch Mathematischer Formeln. Bartsch HJ, Hrsg. 21. Auflage Leipzig: Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag.

Bates GP, Wainwright BJ, Williamson R, Brown SD. 1986. Microdissection of and microcloning from the short arm of human chromosome 2. Molecular and cellular biology, 6(11):3826-30.

Bauman JGJ,Wiegant J, Borst P, van Duijn P. 1980.A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA. Experimental Cell Research, 128(2):485-90.

Bayani J, Squire JA. 2004. Traditional banding of chromosomes for cytogenetic analysis. Current protocols in cell biology, Chapter 22:Unit 22.3.

Belmont AS, Braunfeld MB, Sedat JW, Agard DA. 1989. Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro. Chromosoma, 98(2):129-43.

Bellyei S, Szigeti A, Pozsgai E, Boronkai A, Gomori E, Hocsak E, Farkas R, Sumegi B, Gallyas F Jr. 2007. Preventing apoptotic cell death by a novel small heat shock protein. European journal of cell biology, 86(3):161-71.

van Beneden E, Neyt A. 1887. Nouvelles recherches sur la fécondation et la division mitosique chez l'ascaride mégalocéphale. Engelmann, W. Leipzig.

Bianchini L, Birtwisle L, Saâda E, Bazin A, Long E, Roussel JF, Michiels JF, Forest F, Dani C, Myklebost O, Birtwisle-Peyrottes I, Pedeutour F. 2013. Identification of PPAP2B as a novel recurrent translocation partner gene of HMGA2 in lipomas. Genes, chromosomes & cancer, 52(6):580-90.

Bignell GR, Greenman CD, Davies H, Butler AP, Edkins S, Andrews JM, Buck G, Chen L, Beare D, Latimer C, Widaa S, Hinton J, Fahey C, Fu B, Swamy S, Dalgliesh GL, Teh BT, Deloukas P, Yang F, Campbell PJ, Futreal PA, Stratton MR. 2010. Signatures of mutation and selection in the cancer genome. Nature, 463(7283):893-8.

Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzadeh MR, Werne A, McKenzie KA, Kapur R, Ichijo H, Haneline LS. 2005. Enhanced TNF-alpha-induced apoptosis in Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on apoptosis signal-regulating kinase 1. Blood, 106(13):4124-30.

Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acids research, 7(6):1513-23.

Blair LP, Cao J, Zou MR, Sayegh J, Yan Q. 2011. Epigenetic Regulation by Lysine Demethylase 5 (KDM5) Enzymes in Cancer. Cancers, 3(1):1383-1404.

Blumrich A, Zapatka M, Brueckner LM, Zheglo D, Schwab M, Savelyeva L. 2011. The FRA2C common fragile site maps to the borders of MYCN amplicons in neuroblastoma and is associated with gross chromosomal rearrangements in different cancers. Human molecular genetics, 20(8):1488-501.

Bohlander SK, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Rowley JD, Díaz MO. 1992. A method for the rapid sequence-independent amplification of microdissected chromosomal material. Genomics, 13(4):1322-4.

Boveri T. 1888. Zell-Studien II. Die Befruchtung und Teilung des Eies von ascaris megalocephala. Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft, 22:685-882.

Boveri T. 1903. Über die Konstitution der chromatischen Kernsubstanz. Verhandlungen der deutschen Zoologischen Gesellschaft, 13:10-33.

Britzen-Laurent N, Lipnik K, Ocker M, Naschberger E, Schellerer VS, Croner RS, Vieth M, Waldner M, Steinberg P, Hohenadl C, Stürzl M. 2013. GBP-1 acts as a tumor suppressor in colorectal cancer cells. Carcinogenesis, 34(1):153-62.

Brown KA, Simpson ER. 2010. Obesity and breast cancer: progress to understanding the

relationship. Cancer research, 70(1):4-7.

Brüning-Richardson A, Bond J, Alsiary R, Richardson J, Cairns DA, McCormack L, Hutson R, Burns P, Wilkinson N, Hall GD, Morrison EE, Bell SM. 2011. ASPM and microcephalin expression in epithelial ovarian cancer correlates with tumour grade and survival. British journal of cancer,104(10):1602-10.

Budzowska M, Kanaar R. 2009. Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. Cell biochemisty and biophysics, 53(1):17-31.

Bütschli JAO. 1876. Studien über die ersten Entwickelungsvorgänge der Eizelle, die Zelltheilung und die Conjugation der Infusorien. Senckenbergische naturforschende Gesellschaft 10:213-452.

Bunting SF, Nussenzweig A. 2010. Dangerous liaisons: Fanconi anemia and toxic nonhomologous end joining in DNA crosslink repair. Molecular cell, 39(2):164-6.

Burrow AA, Williams LE, Pierce LC, Wang YH. 2009. Over half of breakpoints in gene pairs involved in cancer-specific recurrent translocations are mapped to human chromosomal fragile sites. BMC genomics, 10:59.

Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. 1994. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. Blood, 84(5):1650-5.

Byrnes JJ. 1984. Structural and functional properties of DNA polymerase delta from rabbit bone marrow. Molecular and cellular biochemistry, 62(1):13-24.

Carbone A, Gloghini A, Dotti G. 2008. EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. The oncologist, 13(5):577-85.

Carlton PM. 2008. Three-dimensional structured illumination microscopy and its application to chromosome structure. Cromosome research, 16(3):351-65.

Carotenuto M, Pedone E, Diana D, de Antonellis P, Džeroski S, Marino N, Navas L, Di Dato V, Scoppettuolo MN, Cimmino F, Correale S, Pirone L, Monti SM, Bruder E, Zenko B, Slavkov I, Pastorino F, Ponzoni M, Schulte JH, Schramm A, Eggert A, Westermann F, Arrigoni G, Accordi B, Basso G, Saviano M, Fattorusso R, Zollo M. 2013. Neuroblastoma tumorigenesis is regulated through the Nm23-H1/h-Prune C-terminal interaction. Scientific reports, 3:1351.

Carpenter NJ. 2001. Molecular cytogenetics. Seminars in pediatric neurology, 8(3):135-46.

Casper AM, Nghiem P, Arlt MF, Glover TW. 2002. ATR regulates fragile site stability. Cell, 111(6):779-89.

Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Experimental Cell

Research, 49(1):219-22.

Castella M, Pujol R, Callén E, Ramírez MJ, Casado JA, Talavera M, Ferro T, Muñoz A, Sevilla J, Madero L, Cela E, Beléndez C, de Heredia CD, Olivé T, de Toledo JS, Badell I, Estella J, Dasí Á, Rodríguez-Villa A, Gómez P, Tapia M, Molinés A, Figuera Á, Bueren JA, Surrallés J. 2011a. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. Journal of medical genetics, 48(4):242-50.

Castella M, Pujol R, Callén E, Trujillo JP, Casado JA, Gille H, Lach FP, Auerbach AD, Schindler D, Benítez J, Porto B, Ferro T, Muñoz A, Sevilla J, Madero L, Cela E, Beléndez C, de Heredia CD, Olivé T, de Toledo JS, Badell I, Torrent M, Estella J, Dasí A, Rodríguez-Villa A, Gómez P, Barbot J, Tapia M, Molinés A, Figuera A, Bueren JA, Surrallés J. 2011b. Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. Blood, 117(14):3759-69.

Casula S, Bianco AC. 2012. Thyroid hormone deiodinases and cancer. Frontiers in endocrinology, 3:74.

Ceccaldi R, Briot D, Larghero J, Vasquez N, Dubois d'Enghien C, Chamousset D, Noguera ME, Waisfisz Q, Hermine O, Pondarre C, Leblanc T, Gluckman E, Joenje H, Stoppa-Lyonnet D, Socié G, Soulier J. 2011. Spontaneous abrogation of the G_2DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. The journal of clinical investigation, 121(1):184-94.

Ceccaldi R, Parmar K, Mouly E, Delord M, Kim JM, Regairaz M, Pla M, Vasquez N, Zhang QS, Pondarre C, Peffault de Latour R, Gluckman E, Cavazzana-Calvo M, Leblanc T, Larghero J, Grompe M, Socié G, D'Andrea AD, Soulier J. 2012. Bone marrow failure in fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. Cell Stem Cell, 11(1):36-49.

Ceol CJ, Houvras Y, Jane-Valbuena J, Bilodeau S, Orlando DA, Battisti V, Fritsch L, Lin WM, Hollmann TJ, Ferré F, Bourque C, Burke CJ, Turner L, Uong A, Johnson LA, Beroukhim R, Mermel CH, Loda M, Ait-Si-Ali S, Garraway LA, Young RA, Zon LI. 2011. The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. Nature, 471(7339):513-7.

Cervenka J, Arthur D, Yasis C. 1981. Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic aplastic anemia and Fanconi anemia. Pediatrics, 67(1):119-27.

Chandra S, Levran O, Jurickova I, Maas C, Kapur R, Schindler D, Henry R, Milton K, Batish SD, Cancelas JA, Hanenberg H, Auerbach AD, Williams DA. 2005. A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients. Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy, 12(5):976-84.

Chen C, Wei X, Rao X, Wu J, Yang S, Chen F, Ma D, Zhou J, Dackor RT, Zeldin DC, Wang DW. 2011. Cytochrome P450 2J2 is highly expressed in hematologic malignant diseases and promotes tumor cell growth. The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 336(2):344-55.

Cheng CH, Kuchta RD. 1993. DNA polymerase epsilon: aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity. Biochemistry, 32(33):8568-74.

Cho DH, Jo YK, Roh SA, Na YS, Kim TW, Jang SJ, Kim YS, Kim JC. 2010. Upregulation of SPRR3 promotes colorectal tumorigenesis. Molecular medicine, 16(7-8):271-7.

Chong HC, Tan CK, Huang RL, Tan NS. 2012. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. Journal of oncology, 2012:351089.

Choong LY, Lim SK, Chen Y, Loh MC, Toy W, Wong CY, Salto-Tellez M, Shah N, Lim YP. 2011. Elevated NRD1 metalloprotease expression plays a role in breast cancer growth and proliferation. Genes, chromosomes & cancer, 50(10):837-47.

Christgen M, Noskowicz M, Heil C, Schipper E, Christgen H, Geffers R, Kreipe H, Lehmann U. 2012. IPH-926 lobular breast cancer cells harbor a p53 mutant with temperature-sensitive functional activity and allow for profiling of p53-responsive genes. Laboratory investigation, 92(11):1635-47.

Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. 1999. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. Cytogenetics and Cell Genetics, 84:156–60.

Cioc AM, Wagner JE, MacMillan ML, DeFor T, Hirsch B. 2010. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. American Journal of Clinical Pathology, 133(1):92-100.

Claussen U, Michel S, Mühlig P, Westermann M, Grummt UW, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T. 2002. Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. Cytogenetic and genome research, 98(2-3):136-46.

Cohen AJ, Li FP, Berg S, Marchetto DJ, Tsai S, Jacobs SC, Brown RS. 1979. Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. New England Journal of Medicine, 301(11):592-5.

Constantinou A. 2012. Rescue of replication failure by Fanconi anaemia proteins. Chromosoma, 121(1):21-36.

Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M. 1997. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. Cell, 89(2):215-25.

Crawford DC, Acuña JM, Sherman SL. 2001. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 3(5):359-71.

Crevel G, Bennett D, Cotterill S. 2008. The human TPR protein TTC4 is a putative Hsp90 co-chaperone which interacts with CDC6 and shows alterations in transformed cells. PLoS one,3(3):e0001737.

Cuccarolo P, Viaggi S, Degan P. 2012. New insights into redox response modulation in Fanconi's anemia cells by hydrogen peroxide and glutathione depletors. The FEBS journal, 279(14):2479-94.

Cui T, Chen Y, Knösel T, Yang L, Zöller K, Galler K, Berndt A, Mihlan M, Zipfel PF, Petersen I. 2011. Human complement factor H is a novel diagnostic marker for lung adenocarcinoma. International journal of oncology, 39(1):161-8.

Curatolo A, Limongi ZM, Pelliccia F, Rocchi A. 2007. Molecular characterization of the human common fragile site FRA1H. Genes, chromosomes & cancer, 46(5):487- 93.

Davis CD, Tsuji PA, Milner JA. 2012. Selenoproteins and cancer prevention. Annual review of nutrition, 32:73-95.

Deans AJ, West SC. 2011. DNA interstrand crosslink repair and cancer. Nature reviews. Cancer, 11(7):467-80.

Debacker K, Kooy RF. 2007. Fragile sites and human disease. Human molecular genetics, 16(R2): R150-8.

Debatisse M, El Achkar E, Dutrillaux B. 2006. Common fragile sites nested at the interfaces of early and late-replicating chromosome bands: cis acting components of the G2/M checkpoint? Cell Cycle,5(6):578-81.

Degen M, Brellier F, Schenk S, Driscoll R, Zaman K, Stupp R, Tornillo L, Terracciano L, Chiquet-Ehrismann R, Rüegg C, Seelentag W. 2008. Tenascin-W, a new marker of cancer stroma, is elevated in sera of colon and breast cancer patients. International journal of cancer, 122(11):2454-61.

Dekaban A. 1965. Persisting clone of cells with an abnormal chromosome in a woman previously irradiated. Journal of nuclear medicine, 6(10):740-6.

Denison SR, Simper RK, Greenbaum IF. 2003. How common are common fragile sites in humans: interindividual variation in the distribution of aphidicolin-induced fragile sites. Cytogenetic and genome research, 101(1):8-16.

Dereli-Öz A, Versini G, Halazonetis TD. 2011. Studies of genomic copy number changes in human cancers reveal signatures of DNA replication stress. Molecular oncology, 5(4):308-14.

DeRycke MS, Andersen JD, Harrington KM, Pambuccian SE, Kalloger SE, Boylan KL, Argenta

PA, Skubitz AP. 2009. S100A1 expression in ovarian and endometrial endometrioid carcinomas is a prognostic indicator of relapse-free survival. American journal of clinical pathology, 132(6):846-56.

Digweed M, Hoehn H, Sperling K. 2007. Milestones in Fanconi Anemia Research. In: Schindler D, Hoehn H, Hrsg. Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging. (Monographs in Human Genetics). Erste Auflage Basel, Karger, 23-38.

Dillon LW, Burrow AA, Wang YH. 2010. DNA instability at chromosomal fragile sites in cancer. Current genomics, 11(5):326-37.

Du W, Adam Z, Rani R, Zhang X, Pang Q. 2008. Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. Antioxidants & Redox Signaling, 10(11):1909-21.

Du W, Rani R, Sipple J, Schick J, Myers KC, Mehta P, Andreassen PR, Davies SM, Pang Q. 2012. The FA pathway counteracts oxidative stress through selective protection of antioxidant defense gene promoters. Blood, 119(18):4142-51.

Duckworth-Rysiecki G, Cornish K, Clarke CA, Buchwald M. 1985. Identification of two complementation groups in Fanconi anemia. Somatic cell and molecular genetics, 11(1):35-41.

Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Poggi V, Béka'ssy AN, Scimè R, Pistorio A, Pistoia V. 2003. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. Blood, 102(6):2053-9.

Duker NJ. 2002. Chromosome breakage syndromes and cancer. American Journal of Medical Genetics, 115(3):125-9.

Durkin SG, Glover TW. 2007. Chromosome fragile sites. Annual Review of Genetics, 41:169-92.

Durkin SG, Arlt MF, Howlett NG, Glover TW. 2006. Depletion of CHK1, but not CHK2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites. Oncogene, 25(32):4381-8.

Durkin SG, Ragland RL, Arlt MF, Mulle JG, Warren ST, Glover TW. 2008. Replication stress induces tumor-like microdeletions in FHIT/FRA3B. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 105(1):246-51.

Dutrillaux B, Lejeune J. 1971. Sur une novelle technique d´analyse du caryotype humain. L.R. Acad. Sci. (Paris), 272:2638-40.

Eggert A, Schwab M. 2007. Bösartigem Kinderkrebs Neuroblastom auf der Spur, Neue Biomarker für das klinische Management. Nationales Genomforschungsnetz, Genomxpress Sonderausgabe 2/07:14-17.

El Ayachi I, Baeza N, Fernandez C, Colin C, Scavarda D, Pesheva P, Figarella-Branger D. 2010. KIAA0510, the 3'-untranslated region of the tenascin-R gene, and tenascin-R are overexpressed in pilocytic astrocytomas. Neuropathology and applied neurobiology,

36(5):399-410.

Elsner M, Rauser S, Maier S, Schöne C, Balluff B, Meding S, Jung G, Nipp M, Sarioglu H, Maccarrone G, Aichler M, Feuchtinger A, Langer R, Jütting U, Feith M, Küster B, Ueffing M, Zitzelsberger H, Höfler H, Walch A. 2012. MALDI imaging mass spectrometry reveals COX7A2, TAGLN2 and S100-A10 as novel prognostic markers in Barrett's adenocarcinoma. Journal of proteomics, 75(15):4693-704.

Endres K. 2003. Zellzykluseffekte von Mitomycin C [Dissertation]. Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg.

Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, Altay C, Poole J, Stones D, Kwee ML, van Weel-Sipman M, Havenga C, Morgan N, de Winter J, Digweed M, Savoia A, Pronk J, de Ravel T, Jansen S, Joenje H, Gluckman E, Mathew CG. 2000. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. Blood, 96(13):4064-70.

Fanconi G. 1927. Familiäre, infantile, perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung (Wien), 117:257-280.

Fanconi G. 1967. Familial constitutional panmyelocytopathy, Fanconi's anemia (F.A.).I. Clinical aspects. Seminars in Hematology, 4(3):233-40.

Fang Y, Fu D, Tang W, Cai Y, Ma D, Wang H, Xue R, Liu T, Huang X, Dong L, Wu H, Shen X. 2013. Ubiquitin C-terminal Hydrolase 37, a novel predictor for hepatocellular carcinoma recurrence, promotes cell migration and invasion via interacting and deubiquitinating PRP19. Biochimica et biophysica acta, 1833(3):559-72.

Fantes JA, Green DK, Sharkey A. 1994. Chromosome Sorting by Flow Cytometry Production of DNA Libraries and Gene Mapping. Chromosome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology, 29:205-19.

Farren TW, Giustiniani J, Liu FT, Tsitsikas DA, Macey MG, Cavenagh JD, Oakervee HE, Taussig D, Newland AC, Calaminici M, Bensussan A, Jenner M, Gribben JG, Agrawal SG. 2011. Differential and tumor-specific expression of CD160 in B-cell malignancies. Blood, 118(8):2174-83.

Fechter A, Buettel I, Kuehnel E, Schwab M, Savelyeva L. 2007. Cloning of genetically tagged chromosome break sequences reveals new fragile sites at 6p21 and 13q22. International journal of cancer, 120(11):2359-67.

Fellenberg F, Hartmann TB, Dummer R, Usener D, Schadendorf D, Eichmüller S. 2004. GBP-5 splicing variants: New guanylate-binding proteins with tumor-associated expression and antigenicity. The journal of investigative dermatology, 122(6):1510-7.

Fleming JM, Ginsburg E, Oliver SD, Goldsmith P, Vonderhaar BK. 2012. Hornerin, an S100 family

protein, is functional in breast cells and aberrantly expressed in breast cancer. BMC cancer, 12:266.

Flemming W. 1882. Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. Leipzig, Verlag von F.C.W.Vogel.

Flynn RL, Zou L. 2011. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. Trends in biochemical science, 36(3):133-40.

Fong D, Spizzo G, Gostner JM, Gastl G, Moser P, Krammel C, Gerhard S, Rasse M, Laimer K. 2008. TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Modern pathology, 21(2):186-91.

Ford CE, Hamerton JL. 1956. A Colchicine, Hypotonic Citrat, Sqash Sequence For Mammalian Chromosomes. Stain Technology, 31(6):247-51.

Ford CE, Jones KW, Polani PE, DE Almeida JC, Briggs JH. 1959. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). Lancet, 1(7075):711-3.

Franchitto A, Pichierri P. 2011. Understanding the molecular basis of common fragile sites instability: role of the proteins involved in the recovery of stalled replication forks. Cell cycle, 10(23):4039-46.

Fungtammasan A, Walsh E, Chiaromonte F, Eckert KA, Makova KD. 2012. A genome-wide analysis of common fragile sites: what features determine chromosomal instability in the human genome? Genome research, 22(6):993-1005.

Gerhard DS, Kawasaki ES, Bancroft FC, Szabo P. 1981. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 78(6):3755-9.

Gil-Henn H, Patsialou A, Wang Y, Warren MS, Condeelis JS, Koleske AJ. 2013. Arg/Abl2 promotes invasion and attenuates proliferation of breast cancer in vivo. Oncogene, 32(21):2622-30.

Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, Ondrey FG, Adams GL, Gaffney PM. 2004. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer research, 64(1):55-63.

Glover TW, Stein CK. 1987. Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites. The American Journal of Human Genetics, 41(5): 882–90.

Glover TW, Stein CK. 1988. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. The American Journal of Human Genetics, 43(3):265-73.

Glover TW, Berger C, Coyle J, Echo B. 1984. DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. Human Genetics, 67(2):136-42.

Gmyrek D, Syllm-Rapoport I. 1964. On Fanconi's Anemia. Analysis of 129 cases. Zeitschrift für

Kinderheilkunde, 91:297-337.

Gollin SM. 2007. Mechanisms leading to nonrandom, nonhomologous chromosomal translocations in leukemia. Seminars in cancer biology, 17(1):74-9.

Greenbaum IF, Fulton JK, White ED, Dahm PF. 1997. Minimum sample sizes for identifying chromosomal fragile sites from individuals: Monte Carlo estimation. Human genetics, 101(1):109-12.

Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H. 2002. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. Cytogenetic and Genome Research, 98(2-3):126-35.

Gründker C, Föst C, Fister S, Nolte N, Günthert AR, Emons G. 2010. Gonadotropin-releasing hormone type II antagonist induces apoptosis in MCF-7 and triple-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro and in vivo. Brest cancer research, 12(4):R49.

Guimarães DP, Oliveira IM, de Moraes E, Paiva GR, Souza DM, Barnas C, Olmedo DB, Pinto CE, Faria PA, De Moura Gallo CV, Small IA, Ferreira CG, Hainaut P. 2009. Interferon-inducible guanylate binding protein (GBP)-2: a novel p53-regulated tumor marker in esophageal squamous cell carcinomas. International journal of cancer, 124(2):272-9.

Gus-Brautbar Y, Johnson D, Zhang L, Sun H, Wang P, Zhang S, Zhang L, Chen YH. 2012. The anti-inflammatory TIPE2 is an inhibitor of the oncogenic Ras. Molecular cell, 45(5):610-8.

Hansen RS, Canfield TK, Fjeld AD, Mumm S, Laird CD, Gartler SM. 1997. A variable domain of delayed replication in FRAXA fragile X chromosomes: X inactivation-like spread of late replication. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 94:4587–92.

Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. 2008. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. Science, 19(5868):1352-5.

Hao J, Wang K, Yue Y, Tian T, Xu A, Hao J, Xiao X, He D. 2012. Selective expression of S100A11 in lung cancer and its role in regulating proliferation of adenocarcinomas cells. Molecular and cellular biochemistry, 359(1-2):323-32.

Hare WCD, Singh E. 1979. Cytogenetics in animal reproductions. Slough Commonwealth agricultural bureaux, 96(40):38-51.

Harper ME, Saunders GF. 1981. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. Chromosoma, 83(3):431-439.

Hartmann D, Lucks J, Fuchs S, Schiffmann S, Schreiber Y, Ferreirós N, Merkens J, Marschalek R, Geisslinger G, Grösch S. 2012. Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. International journal of biochemistry & cell biology, 44(4):620-8.

He WP, Zhou J, Cai MY, Xiao XS, Liao YJ, Kung HF, Guan XY, Xie D, Yang GF. 2012. CHD1L protein is overexpressed in human ovarian carcinomas and is a novel predictive biomarker for patients survival. BMC cancer, 12:437.

Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ, Silvey KV, Bakke AC, Keeble WW, Zhi Y, Reifsteck CA, Grompe M, Brown MG, Magenis RE, Olson SB, Bagby GC. 1998. DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. Blood, 91(1):275-87.

Hellman A, Zlotorynski E, Scherer SW, Cheung J, Vincent JB, Smith DI, Trakhtenbrot L, Kerem B. 2002. A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. Cancer cell, 1(1):89-97.

Helmrich A. 2005. Genomweite molekular-zytogenetische Charakterisierung INK4A/ARF-defizienter Mauslymphome und Untersuchungen zur evolutionären Konservierung von Common Fragile Sites [Dissertation]. Technische Universität Dresden.

Helmrich A, Stout-Weider K, Hermann K, Schrock E, Heiden T. 2006. Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes. Genome Research, 16(10):1222-30.

Helmrich A, Ballarino M, Tora L. 2011. Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. Molecular Cell, 44(6):966-77.

Hewett DR ,Handt O ,Hobson L ,Mangelsdorf M , Eyre HJ, Baker E, et al.. 1998. FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis. Molecular Cell, 1(6):773–781.

Hirsch B, Shimamura A, Moreau L, Baldinger S, Hag-alshiekh M, Bostrom B, Sencer S, D'Andrea AD. 2004. Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous chromosomal instability and solid tumors of childhood. Blood, 103(7):2554-9.

Hliscs R, Mühlig P, Claussen U. 1997. The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. Cytogenetics and cell genetics, 76(3-4):167-71.

Hooke R. 1667. Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses: with observations and inquiries thereupon. London 1667.

Hormozian F, Schmitt JG, Sagulenko E, Schwab M, Savelyeva L. 2007. FRA1E common fragile site breaks map within a 370kilobase pair region and disrupt the dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD). Cancer letters, 246(1-2):82-91.

Hosoda W, Sasaki E, Murakami Y, Yamao K, Shimizu Y, Yatabe Y. 2013. BCL10 as a useful marker for pancreatic acinar cell carcinoma, especially using endoscopic ultrasound cytology specimens. Pathology international, 63(3):176-82.

Hou Y, Wang HQ, Ba Y. 2012. High expression of cell division cycle 7 protein correlates with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Medical oncology, 29(5):3498-503.

Howlett NG, Taniguchi T, Durkin SG, D'Andrea AD, Glover TW. 2005. The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. Human molecular genetics, 14(5):693-701.

Hsu TC. 1952. Mammalian Chromosomes invitro.I. The Karyotype Of Men. Journal Of Heredity, 43(4): 167-72.

Hu L, Liu M, Chen L, Chan TH, Wang J, Huo KK, Zheng BJ, Xie D, Guan XY. 2012. SCYL1 binding protein 1 promotes the ubiquitin-dependent degradation of Pirh2 and has tumor-suppressive function in the development of hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis, 33(8):1581-8.

Huebner K, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM. 1998. The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. Annual Review of Genetics, 32:7-31.

Huen NY, Pang AL, Tucker JA, Lee TL, Vergati M, Jochems C, Intrivici C, Cereda V, Chan WY, Rennert OM, Madan RA, Gulley JL, Schlom J, Tsang KY. 2013. Up-regulation of proliferative and migratory genes in regulatory T cells from patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. International journal of cancer, 133(2):373-82.

Iliopoulos D, Guler G, Han SY, Druck T, Ottey M, McCorkell KA, Huebner K. 2006. Roles of FHIT and WWOX fragile genes in cancer. Cancer Letters, 232(1):27-36.

Imerslund, O. 1953. Hypoplastic anemia with multiple abnormalities (Fanconi's anemia). Nordisk Medicine 50(38):1301-4.

Inagaki Y, Yasui K, Endo M, Nakajima T, Zen K, Tsuji K, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arii S, Okanoue T. 2008. CREB3L4, INTS3, and SNAPAP are targets for the 1q21 amplicon frequently detected in hepatocellular carcinoma. Cancer genetics and cytogenetics, 180(1):30-6.

Inoue J, Otsuki T, Hirasawa A, Imoto I, Matsuo Y, Shimizu S, Taniwaki M, Inazawa J. 2004. Overexpression of PDZK1 within the 1q12-q22 amplicon is likely to be associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma. The American journal of pathology, 165(1):71-81.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 409:860-921.

Jacobs PA, Strong JA. 1959. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. Nature, 183(4657):302-3.

Jiang Y, Lucas I, Young DJ, Davis EM, Karrison T, Rest JS, Le Beau MM. 2009. Common fragile

sites are characterized by histone hypoacetylation. Human molecular genetics, 18(23):4501-12.

Jin Q, Chen H, Luo A, Ding F, Liu Z. 2011. S100A14 stimulates cell proliferation and induces cell apoptosis at different concentrations via receptor for advanced glycation end products (RAGE). PloS one, 6(4):e19375.

Kalb R, Neveling K, Herterich S, Schindler D. 2007. Fanconi Anemia Genes: Structure, Mutations, and Genotype-Phenotype Correlations. In: Schindler D Hoehn H, Hrsg. Fanconi Anemia: A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging (Monographs in Human Genetics). Erste Auflage Basel: Karger, 39-55.

Kanome T, Itoh N, Ishikawa F, Mori K, Kim-Kaneyama JR, Nose K, Shibanuma M. 2007. Characterization of Jumping translocation breakpoint (JTB) gene product isolated as a TGF-beta1-inducible clone involved in regulation of mitochondrial function, cell growth and cell death. Oncogene, 26(41):5991-6001.

Kapuscinski J. 1995. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. Biotechnic & Histochemistry, 70(5):220-33.

Katchman BA, Ocal IT, Cunliffe HE, Chang YH, Hostetter G, Watanabe A, Lobello J, Lake DF. 2013. Expression of quiescin sulfhydryl oxidase 1 is associated with a highly invasive phenotype and correlates with a poor prognosis in Luminal B breast cancer. Breast cancer research, 15(2):R28.

Kawabata T, Luebben SW, Yamaguchi S, Ilves I, Matise I, Buske T, Botchan MR, Shima N. 2011. Stalled fork rescue via dormant replication origins in unchallenged S phase promotes proper chromosome segregation and tumor suppression. Molecular cell, 41(5):543-53.

Kee Y, D'Andrea AD. 2010. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. Genes & Development, 24(16):1680-94.

von Koskull A, Aula P. 1973. Nonrandom distribution of chromosome breaks in Fanconi's anemia. Cytogenetics and cell genetics, 12(6):423-34.

Kotzot D, Utermann G. 2005. Uniparental disomy (UPD) other than 15: phenotypes and bibliography updated. American journal of medical genetics. Part A, 136(3):287-305.

Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, et al.. 1991. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. Science, 252(5013):1711-4.

Krummel KA, Roberts LR, Kawakami M, Glover TW, Smith DI. 2000. The characterization of the common fragile site FRA16D and its involvement in multiple myeloma translocations. Genomics, 69(1):37-46.

Kumar GL, Zucker RM. Education guide: Immunhistochemical Staining Methods Fifths Edition,

Kap. Flurosecence In Situ Hybridization (FISH) Imaging. Dako north america, Carpinteria, California, 81-95.

Kuo TC, Tan CT, Chang YW, Hong CC, Lee WJ, Chen MW, Jeng YM, Chiou J, Yu P, Chen PS, Wang MY, Hsiao M, Su JL, Kuo ML. 2013. Angiopoietin-like protein 1 suppresses SLUG to inhibit cancer cell motility. The journal of clinical investigation, 123(3):1082-95.

Kutler DI, Auerbach AD. 2004. Fanconi anemia in Ashkenazi Jews. Familial Cancer, 3(3-4):241-8.

Kutler DI, Wreesmann VB, Goberdhan A, Ben-Porat L, Satagopan J, Ngai I, Huvos AG, Giampietro P, Levran O, Pujara K, Diotti R, Carlson D, Huryn LA, Auerbach AD, Singh B. 2003. Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. Journal of the National Cancer Institute, 95(22):1718-21.

La Starza R, Crescenzi B, Pierini V, Romoli S, Gorello P, Brandimarte L, Matteucci C, Kropp MG, Barba G, Martelli MF, Mecucci C. 2007. A common 93-kb duplicated DNA sequence at 1q21.2 in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. Cancer genetics and cytogenetics, 175(1):73-6.

Lachmann S, Jevons A, De Rycker M, Casamassima A, Radtke S, Collazos A, Parker PJ. 2011. Regulatory domain selectivity in the cell-type specific PKN-dependence of cell migration. PLoS one, 6(7):e21732.

Lai LA, Kostadinov R, Barrett MT, Peiffer DA, Pokholok D, Odze R, Sanchez CA, Maley CC, Reid BJ, Gunderson KL, Rabinovitch PS. 2010. Deletion at fragile sites is a common and early event in Barrett's esophagus. Molecular cancer research, 8(8):1084-94.

Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 78:6633-7.

Lazarus KA, Wijayakumara D, Chand AL, Simpson ER, Clyne CD. 2012. Therapeutic potential of Liver Receptor Homolog-1 modulators. The journal of steroid biochemistry and molecular biology, 130(3-5):138-46.

Le Beau MM, Rassool FV, Neilly ME, Espinosa R 3rd, Glover TW, Smith DI, McKeithan TW. 1998. Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. Human Molecular Genetics, 7(4):755-61.

Le Tallec B, Dutrillaux B, Lachages AM, Millot GA, Brison O, Debatisse M. 2011. Molecular profiling of common fragile sites in human fibroblasts. Nature structural and molecular biology, 18(12):1421-3.

Lee SB, Ho JN, Yoon SH, Kang GY, Hwang SG, Um HD. 2009. Peroxiredoxin 6 promotes lung

cancer cell invasion by inducing urokinase-type plasminogen activator via p38 kinase, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. Molecules and cells, 28(6):583-8.

Leistritz L. 2008. Vorlesung Sommersemester 2008, Medizinische Biometrie für Humanmediziner. IMSID Jena.

Lejeune J, Turpin R, Gautier M. 1959. Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). Bull Acad Nat Med, 143(11-12):256-65.

Lejeune J, La Fourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R. 1963. Trois cas de deletion partielle du bras court d'un chromosome 5. C.R. Acad. Sci. (Paris), 257: 3098-102.

Leśniak W, Słomnicki ŁP, Filipek A. 2009. S100A6 - new facts and features. Biochemical and biophysical research communications, 390(4):1087-92.

Li VS, Reed M, Zheng Y, Kohn H, Tang M. 2000. C5 cytosine methylation at CpG sites enhances sequence selectivity of mitomycin C-DNA bonding. Biochemistry, 39(10):2612-8.

Li X, Le Beau MM, Ciccone S, Yang FC, Freie B, Chen S, Yuan J, Hong P, Orazi A, Haneline LS, Clapp DW. 2005. Ex vivo culture of Fancc-/- stem/progenitor cells predisposes cells to undergo apoptosis, and surviving stem/progenitor cells display cytogenetic abnormalities and an increased risk of malignancy. Blood, 105(9):3465-71.

Li C, Liu VW, Chiu PM, Chan DW, Ngan HY. 2012. Over-expressions of AMPK subunits in ovarian carcinomas with significant clinical implications. BMC cancer, 12:357.

Lichter P, Cremer T, Borden J, Mannelidis L, Ward DC. 1988. Delination of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Human Genetics, 80:224-346.

Liehr T. 2009. Fluoreszenz In Situ Hybridization (FISH) – Application Guide. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

Liehr T, Heller A, Starke H, Claussen U. 2001. High quality CGH slides irrespecitve of used lymphocyte suspension. Technical Tips Online, 6(1):48-50.

Liehr T, Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Weier H-UG, Claussen U. 2002a. Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. Cytogenetic and Genome Research, 97:43–50.

Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U. 2002b. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. International Journal of Molecular Medicine,9(4):335-9.

Liehr T, Starke H, Weise A, Lehrer H, Claussen U. 2004. Multicolor FISH probe sets and their applications. Histology and Histopathology, 19:229-37.

Liehr T, Kosayakova N, Schröder J, Ziegler M, Kreskowski K, Pohle B, Bhatt S, Theuss L, Wilhelm

K, Weise A, Mrasek K. 2011. Evidence for correlation of fragile sites and chromosomal breakpoints in carriers of constitutional balanced chromosomal rearrangements. Balkan Journal of Medical Genetics, 14(2): 13-16.

Limongi MZ, Pelliccia F, Rocchi A. 2003. Characterization of the human common fragile site FRA2G. Genomics, 81(2):93-7.

Lin HC, Lai PY, Lin YP, Huang JY, Yang BC. 2012. Fas ligand enhances malignant behavior of tumor cells through interaction with Met, hepatocyte growth factor receptor, in lipid rafts. Journal of biological chemistry, 287(24):20664-73.

Lin H, Huang JF, Qiu JR, Zhang HL, Tang XJ, Li H, Wang CJ, Wang ZC, Feng ZQ, Zhu J. 2013. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer. Experimental and molecular pathology, 94(1):73-8.

Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S, Andreassen PR, Cantor SB. 2005. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCJ. Cancer cell,8(3):255-65.

Liu LM, Yan MG, Yang DH, Sun WW, Zhang JX. 2011. PIAS3 expression in human gastric carcinoma and its adjacent non-tumor tissues. Clinics and research in hepatology and gastroenterology, 35(5):393-8.

Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DF, Savoia A, Cheng NC, van Berkel CG, Strunk MH, Gille JJ, Pals G, Kruyt FA, Pronk JC, Arwert F, Buchwald M, Joenje H. 1996. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. Nature Genetics, 14(3):320-3.

Lobitz S, Velleuer E. 2006. Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. Nature Reviews, Cancer, 6(11):893-8.

Luciani P, Ferruzzi P, Arnaldi G, Crescioli C, Benvenuti S, Nesi G, Valeri A, Greeve I, Serio M, Mannelli M, Peri A. 2004. Expression of the novel adrenocorticotropin-responsive gene selective Alzheimer's disease indicator-1 in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas. The journal of clinical endocrinology and metabolism, 89(3):1332-9.

Lukusa T, Fryns JP. 2008. Human chromosome fragility. Biochimica et biophysica acta, 1779(1):3-16.

Lukusa T, Meulepas E, Fryns JP, Van den Berghe H, Cassiman JJ. 1991. "Spontaneous" FRA16B is a hot spot for sister chromatid exchanges. Human Genetics, 87(5):583-6.

Magenis RE, Hecht F, Lovrien EW. 1970. Heritable fragile site on chromosome 16: probable localization of haptoglobin locus in man. Science, 170(3953):85-7.

Mahadevan D, Spier C, Della Croce K, Miller S, George B, Riley C, Warner S, Grogan TM, Miller

TP. 2005. Transcript profiling in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, and diffuse large B-cell lymphoma identifies distinct tumor profile signatures. Molecular cancer therapeutics, 4(12):1867-79.

Malcom S, Barton P, Murphy CS, Ferguson-Smith MA. 1981. Chromosomal localization of a single copy gene by in situ hybridization: human beta globin genes on the short arm of chromosome 11. Ann Hum Genet., 45:135-41.

Mani M, Carrasco DE, Zhang Y, Takada K, Gatt ME, Dutta-Simmons J, Ikeda H, Diaz-Griffero F, Pena-Cruz V, Bertagnolli M, Myeroff LL, Markowitz SD, Anderson KC, Carrasco DR. 2009. BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells. Cancer research, 69(19):7577-86.

Marine JC. 2012. Spotlight on the role of COP1 in tumorigenesis. Nature reviews. Cancer, 12(7):455-64.

Massi D, Landriscina M, Piscazzi A, Cosci E, Kirov A, Paglierani M, Di Serio C, Mourmouras V, Fumagalli S, Biagioli M, Prudovsky I, Miracco C, Santucci M, Marchionni N, Tarantini F. 2010. S100A13 is a new angiogenic marker in human melanoma. Modern pathology, 23(6):804-13.

McAvoy S, Ganapathiraju SC, Ducharme-Smith AL, Pritchett JR, Kosari F, Perez DS, Zhu Y, James CD, Smith DI. 2007. Non-random inactivation of large common fragile site genes in different cancers. Cytogenetic and genome research, 118(2-4):260-9.

McAvoy S, Zhu Y, Perez DS, James CD, Smith DI. 2008. Disabled-1 is a large common fragile site gene, inactivated in multiple cancers. Genes, chromosomes & cancer, 47(2):165-74.

McClintock B. 1983. The Significance of Responses of the Genome to Challenge. Nobel Lecture 08.12.1983, S. 184.

Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H. 2004. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. Nature Genetics, 36(11):1219-24.

Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, Hoatlin M, Joenje H, de Winter JP, Wang W. 2005. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. Nature Genetics, 37(9):958-63.

Mendel G. 1866. Versuche über Pflanzehybriden. Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn, Bd. IV:S.347.

Merkley MA, Weinberger PM, Jackson LL, Podolsky RH, Lee JR, Dynan WS. 2009. 2D-DIGE proteomic characterization of head and neck squamous cell carcinoma. Otolaryngology – head and neck surgery, 141(5):626-32.

Mesquita B, Lopes P, Rodrigues A, Pereira D, Afonso M, Leal C, Henrique R, Lind GE, Jerónimo C, Lothe RA, Teixeira MR. 2013. Frequent copy number gains at 1q21 and 1q32 are associated with overexpression of the ETS transcription factors ETV3 and ELF3 in breast cancer irrespective of molecular subtypes. Breast cancer reserach and treatment, 138(1):37-45.

Meyer S, Fergusson WD, Whetton AD, Moreira-Leite F, Pepper SD, Miller C, Saunders EK, White DJ, Will AM, Eden T, Ikeda H, Ullmann R, Tuerkmen S, Gerlach A, Klopocki E, Tönnies H. 2007. Amplification and translocation of 3q26 with overexpression of EVI1 in Fanconi anemia-derived childhood acute myeloid leukemia with biallelic FANCD1/BRCA2 disruption. Genes, chromosomes & cancer, 46(4):359-72.

Meyer S, Neitzel H, Tönnies H. 2012. Chromosomal aberrations associated with clonal evolution and leukemic transformation in fanconi anemia: clinical and biological implications. Anemia, 2012:349837.

Meza-Zepeda LA, Forus A, Lygren B, Dahlberg AB, Godager LH, South AP, Marenholz I, Lioumi M, Flørenes VA, Maelandsmo GM, Serra M, Mischke D, Nizetic D, Ragoussis J, Tarkkanen M, Nesland JM, Knuutila S, Myklebost O. 2002. Positional cloning identifies a novel cyclophilin as a candidate amplified oncogene in 1q21. Oncogene, 21(14):2261-9.

Miró R, Clemente IC, Fuster C, Egozcue J. 1987. Fragile sites, chromosome evolution, and human neoplasia. Human Genetics, 75(4):345-9.

Mishmar D, Rahat A, Scherer SW, Nyakatura G, Hinzmann B, Kohwi Y, Mandel-Gutfroind Y, Lee JR, Drescher B, Sas DE, Margalit H, Platzer M, Weiss A, Tsui LC, Rosenthal A, Kerem B. 1998. Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 95(14):8141-6.

Mishra SK, Siddique HR, Saleem M. 2012. S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence. Cancer metastasis reviews, 31(1-2):163-72.

Moers MHP, Kalle WHJ, Ruiter AGT, Wiegant JCAG, Raap AK, Greve J, De Grooth BG, Van Hulst NF. 1996. Fluorescence in situ hybridization on human metaphase chromosomes detected by near field scanning optical microscopy. Journal of microscopy, 182(1):40-5.

Moldovan GL, D'Andrea AD. 2009. How the fanconi anemia pathway guards the genome. Annual review of genetics, 43:223-49.

Moldovan GL, D'Andrea AD. 2012. To the rescue: the Fanconi anemia genome stability pathway salvages replication forks. Cancer cell, 22(1):5-6.

Moorehead PS, Nowell PC, Mellman WJ. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured

from human peripheral blood. Exp Cell Res, 20:613-6.

Mozdarani H, Ashtiani KA, Mohseni-Meybodi A. 2011. Evaluation of concentration and storage effects of mitomycin C in the diagnosis of Fanconi anemia among idiopatic aplastic anemia patients. Indian journal of human genetics, 17(3):145-51.

Mrasek K, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, Starke H, Claussen U, Liehr T. 2003. Detailed Hylobates lar karyotype defined by 25-color FISH and multicolor banding. International Journal of Molecular Medicine,12(2):139-46.

Mrasek K. 2009. Identifizierung und Charakterisierung von „fragile sites“ und Vergleich mit Neoplasie-assoziierten und evolutionär fixierten Chromosomenbruchpunkten der Hominidae [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Mrasek K, Schoder C, Teichmann AC, Behr K, Franze B, Wilhelm K, Blaurock N, Claussen U, Liehr T, Weise A. 2010. Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. International journal of oncology, 36(4):929-40.

Müller S, Neusser M, Wienberg J. 2002. Towards unlimited colors for fluorescence in-situ hybridization (FISH). Chromosome research, 10(3):223-32.

Mullis KB, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA. 1986. Spezific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51(1): 263-73.

Mullis KB, Fallona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology, 155:335-50.

von Nägeli CW. 1842. Zur Entwicklungsgeschichte des Pollens bei den Phanerogamen. Zürich.

Nakamura Y, Takahashi N, Kakegawa E, Yoshida K, Ito Y, Kayano H, Niitsu N, Jinnai I, Bessho M. 2008. The GAS5 (growth arrest-specific transcript 5) gene fuses to BCL6 as a result of t(1;3)(q25;q27) in a patient with B-cell lymphoma. Cancer genetics and cytogenetics, 182(2):144-9.

Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman A, Tanke HJ, Raap AK. 1989. Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. Cytometry, 10(1):20-7.

Neitzel H. 1986. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. Human genetics, 73(4):320-6.

Neveling K, Bechtold A, Hoehn H. 2007. Genetic instability syndromes with progeroid features. Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie, 40(5):339-48.

Neveling K, Endt D, Hoehn H, Schindler D. 2009. Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. Mutation Research, 668(1-2):73-91.

Newell AE, Akkari YM, Torimaru Y, Rosenthal A, Reifsteck CA, Cox B, Grompe M, Olson SB. 2004. Interstrand crosslink-induced radials form between non-homologous chromosomes, but are absent in sex chromosomes. DNA repair, 3(5):535-42.

Nowak D, Klaumuenzer M, Hanfstein B, Mossner M, Nolte F, Nowak V, Oblaender J, Hecht A, Hütter G, Ogawa S, Kohlmann A, Haferlach C, Schlegelberger B, Braess J, Seifarth W, Fabarius A, Erben P, Saussele S, Müller MC, Reiter A, Buechner T, Weiss C, Hofmann WK, Lengfelder E. 2012. SNP array analysis of acute promyelocytic leukemia may be of prognostic relevance and identifies a potential high risk group with recurrent deletions on chromosomal subband 1q31.3. Genes, chromosomes & cancer, 51(8):756-67.

Ocaña OH, Córcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, Barrallo-Gimeno A, Cano A, Nieto MA. 2012. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. Cancer cell, 22(6):709-24.

Oostra AB, Nieuwint AW, Joenje H, de Winter JP. 2012. Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. Anemia, 2012:238731.

Otsubo K, Kanegane H, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Tamura K, Nomura K, Abe A, Ishii E, Miyawaki T. 2010. ETV6-ARNT fusion in a patient with childhood T lymphoblastic leukemia. Cancer genetics and cytogenetics, 202(1):22-6.

Ozeri-Galai E, Lebofsky R, Rahat A, Bester AC, Bensimon A, Kerem B. 2011. Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. Molecular Cell, 43(1):122-31.

Ozeri-Galai E, Bester AC, Kerem B. 2012. The complex basis underlying common fragile site instability in cancer. Trends in genetics, 28(6):295-302.

Pace P, Mosedale G, Hodskinson MR, Rosado IV, Sivasubramaniam M, Patel KJ. 2010. Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway. Science, 329(5988):219-23.

Pätau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP. 1960. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. Lancet, 1(7128):790-3.

Painter TS. 1923. Studies in mammalian spermatogenesis II. The spermatogenesis of man. Journal of Experimental Zoology, 37:291.

Pardue ML, Gall JG. 1969. Molecular hybrdization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 64(2):600-4.

Pareja F, Ferraro DA, Rubin C, Cohen-Dvashi H, Zhang F, Aulmann S, Ben-Chetrit N, Pines G, Navon R, Crosetto N, Köstler W, Carvalho S, Lavi S, Schmitt F, Dikic I, Yakhini Z, Sinn P, Mills GB, Yarden Y. 2012. Deubiquitination of EGFR by Cezanne-1 contributes to cancer

progression. Oncogene, 31(43):4599-608.

Park JW, Pitot HC, Strati K, Spardy N, Duensing S, Grompe M, Lambert PF. 2010. Deficiencies in the Fanconi anemia DNA damage response pathway increase sensitivity to HPV-associated head and neck cancer. Cancer Research, 70(23):9959-68.

Pasini FS, Maistro S, Snitcovsky I, Barbeta LP, Rotea Mangone FR, Lehn CN, Walder F, Carvalho MB, Brentani MM, Federico MH. 2012. Four-gene expression model predictive of lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. Acta oncologica, 51(1):77-85.

Paz MM, Das TA, Tomasz M. 1999. Mitomycin C Linked to DNA Minor Groove Binding Agents: Synthesis, Reductive Activation, DNA Binding and Cross-Linking Properties and In Vitro Antitumor Activity. Bioorganic & medicinal chemistry, 7(12):2713-26.

Pelliccia F, Bosco N, Curatolo A, Rocchi A. 2008. Replication timing of two human common fragile sites: FRA1H and FRA2G. Cytogenetic and Genome Research, 121(3-4):196-200.

Peng D, Belkhiri A, Hu T, Chaturvedi R, Asim M, Wilson KT, Zaika A, El-Rifai W. 2012. Glutathione peroxidase 7 protects against oxidative DNA damage in oesophageal cells. Gut, 61(9):1250-60.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 83(9):2934-8.

Pise-Masison CA, Radonovich M, Dohoney K, Morris JC, O'Mahony D, Lee MJ, Trepel J, Waldmann TA, Janik JE, Brady JN. 2009. Gene expression profiling of ATL patients: compilation of disease-related genes and evidence for TCF4 involvement in BIRC5 gene expression and cell viability. Blood, 113(17):4016-26.

Popnikolov NK, Dalwadi BH, Thomas JD, Johannes GJ, Imagawa WT. 2012. Association of autotaxin and lysophosphatidic acid receptor 3 with aggressiveness of human breast carcinoma.Tumour Biology, 33(6):2237-43.

Porcu M, Kleppe M, Gianfelici V, Geerdens E, De Keersmaecker K, Tartaglia M, Foà R, Soulier J, Cauwelier B, Uyttebroeck A, Macintyre E, Vandenberghe P, Asnafi V, Cools J. 2012. Mutation of the receptor tyrosine phosphatase PTPRC (CD45) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood, 119(19):4476-9.

Porfirio B, Dallapiccola B, Gandini E. 1985. The effect of aphidicolin on Fanconi's anemia lymphocyte chromosomes. Mutation research, 144(4):257-63.

Pozsgai E, Gomori E, Szigeti A, Boronkai A, Gallyas F Jr, Sumegi B, Bellyei S. 2007. Correlation between the progressive cytoplasmic expression of a novel small heat shock protein (Hsp16.2) and malignancy in brain tumors. BMC cancer, 7:233.

Quinn BA, Dash R, Azab B, Sarkar S, Das SK, Kumar S, Oyesanya RA, Dasgupta S, Dent P, Grant

S, Rahmani M, Curiel DT, Dmitriev I, Hedvat M, Wei J, Wu B, Stebbins JL, Reed JC, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB. 2011. Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer. Expert opinion on investgational drugs, 20(10):1397-411.

Rabl C. 1885. Über Zellteilung. Morphologisches Jahrbuch, 10:214-58.

Rather MI, Nagashri MN, Swamy SS, Gopinath KS, Kumar A. 2013. Oncogenic microRNA-155 down-regulates tumor suppressor CDC73 and promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation: implications for cancer therapeutics. Journal of biological chemistry, 288(1):608-18.

Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, Wurm M, Batish SD, Lach FP, Yetgin S, Neitzel H, Ariffin H, Tischkowitz M, Mathew CG, Auerbach AD, Rahman N. 2007. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. Nature Genetics, 39(2):162-4.

Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. Journal of molecular biology, 113(1):237-51.

Roberti MC, La Starza R, Surace C, Sirleto P, Pinto RM, Pierini V, Crescenzi B, Mecucci C, Angioni A. 2009. RABGAP1L gene rearrangement resulting from a der(Y)t(Y;1)(q12;q25) in acute myeloid leukemia arising in a child with Klinefelter syndrome. Virchows archiv, 454(3):311-6.

Robinson WP. 2000. Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. Bioessays, 22(5):452-9.

Rochowski A, Olson SB, Alonzo TA, Gerbing RB, Lange BJ, Alter BP. 2012. Patients with Fanconi anemia and AML have different cytogenetic clones than de novo cases of AML. Pediatric blood & cancer, 59(5):922-4.

Rose SR, Myers KC, Rutter MM, Mueller R, Khoury JC, Mehta PA, Harris RE, Davies SM. 2012. Endocrine phenotype of children and adults with Fanconi anemia. Pediatric Blood & Cancer, 59(4):690-6.

Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. 2003. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. Blood, 101(3):822-6.

Rosenberg PS, Huang Y, Alter BP. 2004. Individualized risks of first adverse events in patients with Fanconi anemia. Blood, 104(2):350-5.

Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH. 1986. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. Nature, 322(6074):32-8.

Ruiz-Herrera A, Ponsà M, García F, Egozcue J, García M. 2002. Fragile sites in human and Macaca

fascicularis chromosomes are breakpoints in chromosome evolution. Chromosome Research, 10(1):33-44.

Saldivar JC, Miuma S, Bene J, Hosseini SA, Shibata H, Sun J, Wheeler LJ, Mathews CK, Huebner K. 2012. Initiation of genome instability and preneoplastic processes through loss of Fhit expression. PloS genetics, 8(11):e1003077.

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S..

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 74(12):5463-7.

Sankoff D, Deneault M, Turbis P, Allen C. 2002. Chromosomal distributions of breakpoints in cancer, infertility, and evolution. Theoretical Population Biology, 61(4):497-501.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239(4839):487-91.

Sasaki MS, Tonomura A. 1973. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. Cancer Research, 33(8):1829-36.

Sawińska M, Schmitt JG, Sagulenko E, Westermann F, Schwab M, Savelyeva L. 2007. Novel aphidicolin-inducible common fragile site FRA9G maps to 9p22.2, within the C9orf39 gene. Genes, chromosomes & cancer, 46(11):991-9.

Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M. 2011. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. Cell, 145(4):529-42.

Schlacher K, Wu H, Jasin M. 2012. A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. Cancer cell, 22(1):106-16.

Schleiden M. 1838. Beiträge zur Phytogenesis. Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin, 5:137-76.

Schlittgen R. 1990. Einführung in die Statistik. 2., völlig überarbeitete Auflage München, Wien: R. Oldenbourg Verlag.

Schmid W, Schärer K, Baumann T, Fanconi G. 1965. Chromosal fragility in familial panmyelopathy (Fanconi type). Schweizerische Medizinische Wochenschrift, 95(43):1461-1464.

Schoder C. 2009. Molekular(zyto)genetische Charakterisierung von Bruchpunkten in ausgewählten Regionen bei Fanconi Anämie Patienten [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Schoder C, Liehr T, Velleuer E, Wilhelm K, Blaurock N, Weise A, Mrasek K. 2010. New aspects on chromosomal instability: chromosomal break-points in Fanconi anemia patients co-localize

on the molecular level with fragile sites. International journal of oncology, 36(2):307-12.

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. 1996. Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. Science, 273:494-7.

Schroeder TM, Kurth R. 1971. Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease. Blood, 37(1):96-112.

Schroeder TM, Anschütz F, Knopp A. 1964. Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy. Humangenetik, 1(2):194-6.

Schroeder TM, Tilgen D, Krüger J, Vogel F. 1976. Formal genetics of Fanconi's anemia. Human Genetics, 32(3):257-88.

Schwab M. 2006. Fragilome: Determining the role of fragile sites in human disease. Cancer Letters, 232(1):1-3.

Schwab RA, Blackford AN, Niedzwiedz W. 2010. ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells. The EMBO journal, 29(4):806-18.

Schwann T. 1839. Mikroskopische Untersuchungen ueber die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen. Verlag der Sander'schen Buchhandlung (G.E.Reimer).

Schwartz M, Zlotorynski E, Goldberg M, Ozeri E, Rahat A, le Sage C, Chen BP, Chen DJ, Agami R, Kerem B. 2005. Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. Genes & development, 19(22):2715-26.

Schwartz M, Zlotorynski E, Kerem B. 2006. The molecular basis of common and rare fragile sites. Cancer Letters, 232:13–26.

Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet, 2(7731):971-&.

Senger G, Chudoba I, Friedrich U, Tommerup N, Claussen U, Brøndum-Nielsen K. 1997. Prenatal diagnosis of a half-cryptic translocation using chromosome microdissection. Prenatal diagnosis, 17(4):369-74.

Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoehn H, Hentze S, Schroeder-Kurth T. 1995. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. Blood, 85(8):2233-7.

Shaffer LG, Tommerup N. 2005. ISCN 2005 – An International System For Human Cytogenetic Nomenclature. Karger.

Shahzad MM, Shin YH, Matsuo K, Lu C, Nishimura M, Shen DY, Kang Y, Hu W, Mora EM, Rodriguez-Aguayo C, Kapur A, Bottsford-Miller J, Lopez-Berestein G, Rajkovic A, Sood AK. 2013. Biological significance of HORMA domain containing protein 1 (HORMAD1) in epithelial ovarian carcinoma. Cancer letters, 330(2):123-9.

Shaughnessy JD Jr, Qu P, Usmani S, Heuck CJ, Zhang Q, Zhou Y, Tian E, Hanamura I, van Rhee F, Anaissie E, Epstein J, Nair B, Stephens O, Williams R, Waheed S, Alsayed Y, Crowley J, Barlogie B. 2011. Pharmacogenomics of bortezomib test-dosing identifies hyperexpression of proteasome genes, especially PSMD4, as novel high-risk feature in myeloma treated with Total Therapy 3. Blood, 118(13):3512-24.

Shaulian E. 2010. AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? Cell signalling, 22(6):894-9.

Sheaff R, Ilsley D, Kuchta R. 1991. Mechanism of DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin. Biochemistry, 30(35):8590-7.

Shimamura A, Alter BP. 2010. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. Blood Reviews, 24:101–22.

Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 89(18):8794-7.

Sie L, Loong S, Tan EK. 2009. Utility of lymphoblastoid cell lines. Journal of neuroscience research, 87(9):1953-9.

Smalley MJ, Iravani M, Leao M, Grigoriadis A, Kendrick H, Dexter T, Fenwick K, Regan JL, Britt K, McDonald S, Lord CJ, Mackay A, Ashworth A. 2007. Regulator of G-protein signalling 2 mRNA is differentially expressed in mammary epithelial subpopulations and over-expressed in the majority of breast cancers. Breast cancer research, 9(6):R85.

Smeets DFCM. 2004. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. Clinical Biochemistry, 37:439–46.

Smeets D, Scheres J, Hustinx T. 1986. The most common fragile site in man is 3p14. Human genetics, 74(3):330.

Smit AF. 1999. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. Current opinion in genetics & development, 9(6):657-63.

Smith DI, Zhu Y, McAvoy S, Kuhn R. 2006. Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. Cancer Letters, 232(1):48-57.

Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Ballif BA, Gygi SP, Hofmann K, D'Andrea AD, Elledge SJ. 2007. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. Cell, 129(2):289-301.

Spardy N, Duensing A, Charles D, Haines N, Nakahara T, Lambert PF, Duensing S. 2007. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein activates the Fanconi anemia (FA) pathway and causes accelerated chromosomal instability in FA cells. Journal of Virology,

81(23):13265-70.

Spardy N, Duensing A, Hoskins EE, Wells SI, Duensing S. 2008. HPV-16 E7 reveals a link between DNA replication stress, fanconi anemia D2 protein, and alternative lengthening of telomere-associated promyelocytic leukemia bodies. Cancer Research, 68(23):9954-63.

Speicher MR. 2006. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). In: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Hrsg. Taschenlehrbuch Humangenetik. 7. Auflage Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 149-56.

Speicher MR, Carter NP. 2005. The new cytogenetics: Blurring the boundaries with molecular biology. Nature reviews. Genetics, 6(10):782-92.

Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nature Genetics, 12:368-75.

Spurbeck JL, Zinsmeister AR, Meyer KJ, Jalal SM. 1996. Dynamics of chromosome spreading. American journal of medical genetics, 61(4):387-93.

Srikrishna G. 2012. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. Journal of innate immunity, 4(1):31-40.

Staden R. 1979. A strategy of DNA sequencing employing computer programs. Nucleic Acids Research, 6(7):2601-10.

Stein CK, Glover TW, Palmer JL, Glisson BS. 2002. Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. Genes, Chromosomes & Cancer, 34(3):333-40.

Stoepker C, Hain K, Schuster B, Hilhorst-Hofstee Y, Rooimans MA, Steltenpool J, Oostra AB, Eirich K, Korthof ET, Nieuwint AW, Jaspers NG, Bettecken T, Joenje H, Schindler D, Rouse J, de Winter JP. 2011. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. Nature Genetics, 43(2):138-41.

Stokes PH, Liew CW, Kwan AH, Foo P, Barker HE, Djamirze A, O'Reilly V, Visvader JE, Mackay JP, Matthews JM. 2013. Structural basis of the interaction of the breast cancer oncogene LMO4 with the tumour suppressor CtIP/RBBP8. Journal of molecular biology, 425(7):1101-10.

Strasburger E. 1875. Über Vorgänge bei der Befruchtung. Tageblatt der 48. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Graz. 18. - 24. Sept. 1875.

Strasburger E. 1884. Die Controversen der indirecten Kerntheilung. Archiv für Mikroskopische Anatomie, 23:246-304.

Strathdee CA, Duncan AM, Buchwald M. 1992a. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. Nature Genetics, 1(3):196-8.

Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. 1992b. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. Nature, 358(6385):434.

Su DM, Zhang Q, Wang X, He P, Zhu YJ, Zhao J, Rennert OM, Su YA. 2009. Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy. Molecular cancer therapeutics, 8(5):1292-304.

Sugimoto M, Tahara H, Ide T, Furuichi Y. 2004. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. Cancer research, 64(10):3361-4.

Sutherland GR. 1979a. Heritable fragile sites on human chromosomes II. Distribution, phenotypic effects, and cytogenetics. American journal of human genetics, 31(2):136-48.

Sutherland GR. 1979b. Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. American journal of human genetics, 31(2):125-35.

Sutherland GR. 1979c. Heritable fragile sites on human chromosomes. III. Detection of fra(X)(q27) in males with X-linked mental retardation and in their female relatives. Human genetics, 53(1):23-27.

Sutherland GR. 2003. Rare fragile sites. Cytogenetic and genome research, 100(1-4):77-84.

Sutherland GR, Baker E. 2000. The clinical significance of fragile sites on human chromosomes. Clinical Genetics, 58(3):157-61.

Sutherland GR, Baker E, Richards RI. 1998. Fragile Sites still breaking. Trends in genetics, 14(12):501-6.

Sutherland GR, Baker E, Seshadri RS. 1980. Heritable fragile sites on human chromosomes. V. A new class of fragile site requiring BrdU for expression. American Journal of Human Genetics, 32(4):542-8.

Sutherland GR, Jacky PB, Baker E. 1984. Heritable fragile sites on human chromosomes. XI. Factors affecting expression of fragile sites at 10q25, 16q22, and 17p12. American Journal of Human Genetics. 36:110–22.

Sutton WS. 1903. The chromosome inherity. Biol Bull, 4:231-48.

Swift M. 1971. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. Nature, 230:370–3.

Takahashi Y, Hori T, Cooper TK, Liao J, Desai N, Serfass JM, Young MM, Park S, Izu Y, Wang HG. 2013. Bif-1 haploinsufficiency promotes chromosomal instability and accelerates Myc-driven lymphomagenesis via suppression of mitophagy. Blood, 121(9):1622-32.

Taniguchi T, D'Andrea AD. 2006. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. Blood, 107(11):4223-33.

Teh MT, Parkinson EK, Thurlow JK, Liu F, Fortune F, Wan H. 2011. A molecular study of desmosomes identifies a desmoglein isoform switch in head and neck squamous cell carcinoma. Journal of oral pathology & medicine, 40(1):67-76.

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. Genomics, 13(3):718-25.

Thirumulu Ponnuraj K, Bin Alwi Z. 2009. Cytogenetics: Past, present and future. Malaysian Journal of Medical Sciences , 16(2):4-9.

Tijo JH, Levan A. 1956. The chromosome number in man. Hereditas, 42:1-6.

Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, Moses R, Grompe M. 2001. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. Molecular Cell, 7(2):241-8.

Tomasz M. 1995. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). Chemistry & biology, 2(9):575-9.

Tripathi SC, Matta A, Kaur J, Grigull J, Chauhan SS, Thakar A, Shukla NK, Duggal R, DattaGupta S, Ralhan R, Siu KW. 2010. Nuclear S100A7 is associated with poor prognosis in head and neck cancer. PloS one, 5(8):e11939.

Tsantoulis PK, Kotsinas A, Sfikakis PP, Evangelou K, Sideridou M, Levy B, Mo L, Kittas C, Wu XR, Papavassiliou AG, Gorgoulis VG. 2008. Oncogene-induced replication stress preferentially targets common fragile sites in preneoplastic lesions. A genome-wide study. Oncogene, 27(23):3256-64.

Tse W, Zhu W, Chen HS, Cohen A. 1995. A novel gene, AF1q, fused to MLL in t(1;11) (q21;q23), is specifically expressed in leukemic and immature hematopoietic cells. Blood, 85(3):650-6.

Uehlinger E. 1929. Konstitutionelle Infantile (Perniciosaartige) Anämie. Journal of Molecular Medicine, 8(32):1501-3.

Ueki T, Park JH, Nishidate T, Kijima K, Hirata K, Nakamura Y, Katagiri T. 2009. Ubiquitination and downregulation of BRCA1 by ubiquitin-conjugating enzyme E2T overexpression in human breast cancer cells. Cancer research, 69(22):8752-60.

Vasudevan SA, Shang X, Chang S, Ge N, Diaz-Miron JL, Russell HV, Hicks MJ, Ludwig AD, Wesson CL, Burlingame SM, Kim ES, Khan J, Yang J, Nuchtern JG. 2009. Neuroblastoma-derived secretory protein is a novel secreted factor overexpressed in neuroblastoma. Molecular cancer therapeutics, 8(8):2478-89.

Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, Neveling K, Endt D, Kesterton I, Autore F, Fraternali F, Freund M, Hartmann L, Grimwade D, Roberts RG, Schaal H, Mohammed S, Rahman N, Schindler D, Mathew CG. 2010. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. Nature Genetics, 42(5):406-9.

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al.. 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region

exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell, 65(5):905-14.

Verma RS, Babu A. 1995. Human chromosomes. Principles and techniques. 2nd edition. McGraw-Hill, New York

Virchow R. 1855. Cellularpathologie. Archiv für pathologische Anatomie, 8.

Visone R, Veronese A, Rassenti LZ, Balatti V, Pearl DK, Acunzo M, Volinia S, Taccioli C, Kipps TJ, Croce CM. 2011. miR-181b is a biomarker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 118(11):3072-9.

Waldeyer W. 1888. Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. Arch Mikrosk Anat, 32:1-22.

Wang W. 2007. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. Nature Reviews. Genetics, 8(10):735-48.

Wang L, Yu J, Ni J, Xu XM, Wang J, Ning H, Pei XF, Chen J, Yang S, Underhill CB, Liu L, Liekens J, Merregaert J, Zhang L. 2003. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) is over-expressed in malignant epithelial tumors. Cancer letters, 200(1):57-67.

Wang Q, Williamson M, Bott S, Brookman-Amissah N, Freeman A, Nariculam J, Hubank MJ, Ahmed A, Masters JR. 2007. Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. Oncogene, 26(45):6560-5.

Wang LC, Stone S, Hoatlin ME, Gautier J. 2008. Fanconi anemia proteins stabilize replication forks. DNA repair, 7(12):1973-81.

Wang N, Ma Q, Wang Y, Ma G, Zhai H. 2010. CacyBP/SIP expression is involved in the clinical progression of breast cancer. World journal of surgery, 34(11):2545-52.

Wang X, Raulji P, Mohapatra SS, Patel R, Hellermann G, Kong X, Vera PL, Meyer-Siegler KL, Coppola D, Mohapatra S. 2011. Natriuretic peptide receptor a as a novel target for prostate cancer. Molecular cancer, 10:56.

Wang X, Chen J, Li F, Lin Y, Zhang X, Lv Z, Jiang J. 2012. MiR-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of β-catenin. Biochemical and biophysical research communications, 428(4):525-31.

Watanabe Y, Maekawa M. 2013. R/G-band boundaries: genomic instability and human disease. Clinica chimica acta, 419:108-12.

Waters JJ, Barlow AL, Gould CP. 1998. Demystified … FISH. Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology, 51(2): 62–70.

Weise A. 2004. Identifizierung und Charakterisierung putativ evolutionär relevanter Genomregionen der Hominidae [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, Liehr T, Kosyakova N. 2008. Molecular Definition of High-resolution Multicolor Banding Probes: First Within the

Human DNA Sequence Anchored FISH Banding Probe Set. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 56(5):487-93.

Wilke CM, Hall BK, Hoge A, Paradee W, Smith DI, Glover TW. 1996. FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. Human Molecular Genetics, 5(2):187-95.

Wilkinson K, Velloso ER, Lopes LF, Lee C, Aster JC, Shipp MA, Aguiar RC. 2003. Cloning of the t(1;5)(q23;q33) in a myeloproliferative disorder associated with eosinophilia: involvement of PDGFRB and response to imatinib. Blood, 102(12):4187-90.

de Winter JP, Joenje H. 2009. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. Mutation Research, 668(1-2):11-9.

de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, van Berkel CG, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk JC, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M, Joenje H. 1998. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. Nature Genetics,20(3):281-3.

de Winter JP, Léveillé F, van Berkel CG, Rooimans MA, van Der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater PA, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk JC, Mathew CG, Digweed M, Buchwald M, Joenje H. 2000a. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. American Journal of Human Genetics,67(5):1306-8.

de Winter JP, Rooimans MA, van Der Weel L, van Berkel CG, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, Arwert F, Mathew CG, Scheper RJ, Hoatlin ME, Buchwald M, Joenje H. 2000b. The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. Nature Genetics, 24(1):15-6.

Wolf S, Haase-Kohn C, Pietzsch J. 2011. S100A2 in cancerogenesis: a friend or a foe? Amino acids, 41(4):849-61.

Xiong X, Zhao Y, He H, Sun Y. 2011. Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. Oncogene, 30(15):1798-811.

Xu X, Qiao M, Zhang Y, Jiang Y, Wei P, Yao J, Gu B, Wang Y, Lu J, Wang Z, Tang Z, Sun Y, Wu W, Shi Q. 2010. Quantitative proteomics study of breast cancer cell lines isolated from a single patient: discovery of TIMM17A as a marker for breast cancer. Proteomics, 10(7):1374-90.

Yamaguchi M, Yamamoto K, Miura O. 2003. Aberrant expression of the LHX4 LIM-homeobox gene caused by t(1;14)(q25;q32) in chronic myelogenous leukemia in biphenotypic blast crisis. Genes, chromosomes & cancer, 38(3):269-73.

Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, Fukami K. 2010. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase Ialpha are required for invadopodia formation in human breast cancer cells. Cancer science, 101(7):1632-8.

Yan X, Takahara M, Xie L, Oda Y, Nakahara T, Uchi H, Takeuchi S, Tu Y, Moroi Y, Furue M. 2011. Stromal expression of Cathepsin K in squamous cell carcinoma. Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology, 25(3):362-5.

Yang Y, Lim SK, Choong LY, Lee H, Chen Y, Chong PK, Ashktorab H, Wang TT, Salto-Tellez M, Yeoh KG, Lim YP. 2010. Cathepsin S mediates gastric cancer cell migration and invasion via a putative network of metastasis-associated proteins. Journal of proteome research, 9(9):4767-78.

Yang B, Cao L, Liu B, McCaig CD, Pu J. 2013a. The transition from proliferation to differentiation in colorectal cancer is regulated by the calcium activated chloride channel A1. PLoS one, 8(4): e60861.

Yang T, Zhang XB, Zheng ZM. 2013b. Suppression of KIF14 expression inhibits hepatocellular carcinoma progression and predicts favorable outcome. Cancer science, 104(5):552-7.

Yoon SY, Kim JM, Oh JH, Jeon YJ, Lee DS, Kim JH, Choi JY, Ahn BM, Kim S, Yoo HS, Kim YS, Kim NS. 2006. Gene expression profiling of human HBV- and/or HCV-associated hepatocellular carcinoma cells using expressed sequence tags. International journal of oncology, 29(2):315-27.

Yu S, Mangelsdorf M, Hewett DR, Hobson L, Baker E, Eyre HJ, et al.. 1997. Human chromosomal fragile site FRA16B is an amplified AT-rich minisatellite repeat. Cell, 88(3):367-374.

Yuan WC, Lee YR, Huang SF, Lin YM, Chen TY, Chung HC, Tsai CH, Chen HY, Chiang CT, Lai CK, Lu LT, Chen CH, Gu DL, Pu YS, Jou YS, Lu KP, Hsiao PW, Shih HM, Chen RH. 2011. A Cullin3-KLHL20 Ubiquitin ligase-dependent pathway targets PML to potentiate HIF-1 signaling and prostate cancer progression. Cancer cell, 20(2):214-28.

Yunis JJ, Prakash O. 1982. The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. Science, 215(4539):1525-30.

Zanke B, Squire J, Griesser H, Henry M, Suzuki H, Patterson B, Minden M, Mak TW. 1994. A hematopoietic protein tyrosine phosphatase (HePTP) gene that is amplified and overexpressed in myeloid malignancies maps to chromosome 1q32.1. Leukemia, 8(2):236-44.

Zakrzewski S, Sperling K. 1980. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. Human Genetics, 56(1):81-4.

van Zeeburg HJ, Snijders PJ, Wu T, Gluckman E, Soulier J, Surralles J, Castella M, van der Wal JE,

Wennerberg J, Califano J, Velleuer E, Dietrich R, Ebell W, Bloemena E, Joenje H, Leemans CR, Brakenhoff RH. 2008. Clinical and molecular characteristics of squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. Journal of the National Cancer Institute, 100(22):1649-53.

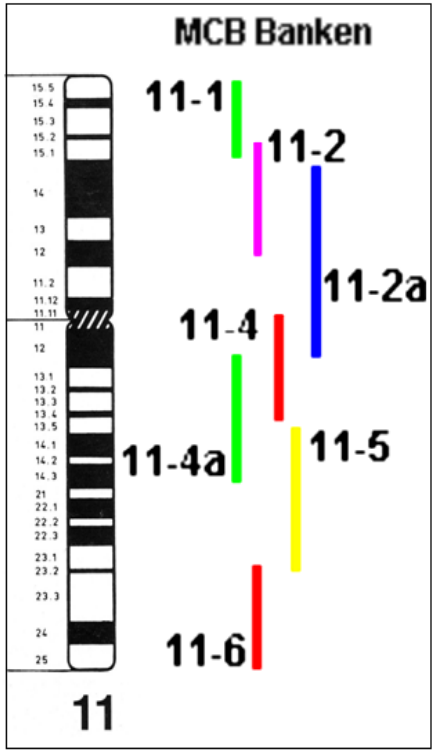
Zhang S, Li F, Younes M, Liu H, Chen C, Yao Q. 2013. Reduced selenium-binding protein 1 in breast cancer correlates with poor survival and resistance to the anti-proliferative effects of selenium. PLoS one, 8(5):e63702.

Zhou J, Yu Q, Chng WJ. 2011. TXNIP (VDUP-1, TBP-2): a major redox regulator commonly suppressed in cancer by epigenetic mechanisms. The international journal of biochemistry& cell biology, 43(12):1668-73.

Zimonjic DB, Druck T, Ohta M, Kastury K, Croce CM, Popescu NC, Huebner K. 1997. Positions of chromosome 3p14.2 fragile sites (FRA3B) within the FHIT gene. Cancer research, 57(6):1166-70.

Zlotorynski E, Rahat A, Skaug J, Ben-Porat N, Ozeri E, Hershberg R, Levi A, Scherer SW, Margalit H, Kerem B. 2003. Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. Molecular and cell biology, 23(20):7143-51.

8 Anhang



Zahl der Banken	MCB Bank	Markierung	Banden nach Chipdaten	MB nach Chip
1	11-1	SG	pter-p15.1	0.00-20.76
2	11-2	TR	p15.2-p12	15.15-38.03
3	11-2a: 28-02-07N3	DEAC	p15.1-q12.2	18.16-60.76
4	11-4	SO	p11.12-q14.1	50.20-72.04
5	11-4a: 13-02-07N1	SG	q12.1-q14.3	58.46-90.55
6	11-5	BIO	q13.5-q23.2	76.26-113.31
7	11-6	SO	q23.1-qter	112.43-134.37

Abb. 8.1: MCB-Markierungsschema des Chromosoms 11. Abkürzungen: SG: Spectrum Green; TR: Texas Red; DEAC: Diethylamino-Cumarin; SO: Spectrum Orange; BIO: Hapten, Biotin-16-dUTP detektiert mit FluoroLinkCy5-labelled -Streptavidin.

Markierungsschema der wcps für den M-FISH-Mix

Chr.	Spectrum Green	Spectrum Orange	Texas Red	Biotin-16-dUTP/Cy5	DEAC
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
X					
Y					

Abb 8.2: Markierungsschema der wcps für den M-FISH-Mix. Eingefärbte Bereiche geben die für das jeweilige Chromosom genutzte Fluorochrom-Kombination wieder.

Tab. 8.1: Prozentanteil der MPP der einzelnen Suspensionen in Abhängigkeit der Bruchanzahl/MPP nach MMC-Inubation undAngabe der dazugehörigen Mittelwerte.

Bruch/MPP	**Anteil MPP mit bestimmter Bruchzahl in % in den jeweiligen Suspensionen**							
	Kontrollpersonen			FA-Patienten				
	Ko_{1B}	Ko_{2B}	Mittel	FA_{1B}	FA_{2B}	FA_{3B}	FA_{4B}	Mittel
0	72,00	69,00	70,50	0,00	1,00	0,00	10,00	2,75
1	12,00	13,00	12,50	5,00	6,00	0,00	5,00	4,00
2	7,00	11,00	9,00	4,00	4,00	1,00	10,00	4,75
3	6,00	5,00	5,50	7,00	4,00	0,00	8,00	4,75
4	2,00	2,00	2,00	10,00	15,00	4,00	7,00	9,00
5	1,00	0,00	0,50	2,00	10,00	6,00	7,00	6,25
6	0,00	0,00	0,00	10,00	8,00	4,00	10,00	8,00
7	0,00	0,00	0,00	7,00	9,00	2,00	6,00	6,00
8	0,00	0,00	0,00	9,00	4,00	4,00	3,00	5,00
9	0,00	0,00	0,00	7,00	8,00	5,00	5,00	6,25
10	0,00	0,00	0,00	2,00	6,00	6,00	4,00	4,50
>10	0,00	0,00	0,00	37,00	25,00	68,00	25,00	38,75

Tab. 8.2: Prozentanteil der MPP der einzelnen Suspensionen in Abhängigkeit der Bruchanzahl/MPP nach Aph-Inubation undAngabe der dazugehörigen Mittelwerte.
Anmerkung. Die Ergebnisse der Suspension FA_{3C} wurde bei der Berechnung der Mittelwerte der FA-Suspensionen vernachlässigt.

Bruch/MPP	**Anteil MPP mit bestimmter Bruchzahl in % in den jeweiligen Suspensionen**							
	Kontrollpersonen			FA-Patienten				
	Ko_{1C}	Ko_{2C}	Mittel	FA_{1C}	FA_{2C}	FA_{3C}	FA_{4C}	Mittel
0	26,00	24,00	25,00	93,00	81,00	(24,00)	91,00	88,33
1	19,00	21,00	20,00	5,00	15,00	(21,00)	5,00	8,33
2	21,00	15,00	18,00	2,00	3,00	(13,00)	3,00	2,67
3	11,00	21,00	16,00	0,00	0,00	(12,00)	1,00	0,33
4	8,00	10,00	9,00	0,00	1,00	(8,00)	0,00	0,33
5	7,00	3,00	5,00	0,00	0,00	(8,00)	0,00	0,00
6	1,00	4,00	2,50	0,00	0,00	(0,00)	0,00	0,00
7	2,00	2,00	2,00	0,00	0,00	(5,00)	0,00	0,00
8	2,00	0,00	1,00	0,00	0,00	(1,00)	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	(2,00)	0,00	0,00
10	2,00	0,00	1,00	0,00	0,00	(2,00)	0,00	0,00
>10	1,00	0,00	0,50	0,00	0,00	(4,00)	0,00	0,00

Tab. 8.3: Übersicht zu den Chromatidbrüchen der verschiedenen Suspensionen. Anmerkung: Ko = Kontrollperson, FA = FA-Patient. Index A = natives Material, Index B = MMC-Inkubation, Index C= Aph-Inkubation. Chromosomenbanden: dünn: helle Banden, fett: dunkle Banden, kursive: Heterochromatin der Zentromere/ perizentrischen Regionen. Die angegebene Summe entspricht der Summe der Chromatidbrüche des jeweiligen Chromosoms der Suspension. Fortsetzung auf den folgenden Seiten.

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
1p36.3					1	1		14			9			15			6	
1p36.2								3						2			1	
1p36.1								6		1	6			11			12	
1p35																		
1p34								7			3		1	8			5	
1p33																		
1p32		1	1				1	13		1	6		1	10	3		8	
1p31								6		1	2			9			4	
1p22			4			3		4			3			7	4		9	
1p21.3			2		1										1			1
1p21.3~22			1															
1p21											1			2	1		1	
1p13.3																		
1p13.2																		
1p13.1																		
1p13					2			4			8			7	2		8	
1p12																		
1p11		2	2			4		6						4	3		5	
1q11		3			2	1		2			3			8			4	
1q12		1			7			9			1			5	1		6	
1q21					3	1		12			13			22			19	
1q22											1						1	
1q23								1			1	1		4	1		2	
1q24								1									1	
1q25			1			1		10			2		2	13	6		5	
1q31			1					7						3	1		3	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
1q32								2			4			13			7	
1q41			1					1						4			2	
1q42								2			4			9	1		4	
1q42.1																		
1q42.2																		
1q42.3																		
1q43								1						1	2			
1q44		1	2			3					1			5	5		2	
Summe	Σ 0	Σ 8	Σ 15	Σ 0	Σ 16	Σ 14	Σ 1	Σ 111	Σ 0	Σ 3	Σ 68	Σ 1	Σ 4	Σ 162	Σ 31	Σ 0	Σ 115	Σ 1
2p25			1			1		3			4	1		6	1		5	
2p24~25														1				
2p24			3			2								6	1		1	
2p23~24											1			1				
2p22~23																	1	
2p23							1	4			6			4	1		3	
2p22											1			2				
2p21			2					1			5			3	1		4	
2p16			1														1	
2p15~16						2												
2p15			4			4		5			1			2	2		4	
2p14																		
2p13								8			9			12	2		7	
2p12~13											1							
2p12																		
2p11.2			1			2					1			2			3	
2p11.1		1						2						10			3	
2q11.1					3			7			1			3			4	
2q11.2								4			4			6			5	
2q12								1										

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
2q12~13														1				
2q13								4			8			4	1		5	
2q14														2				
2q14.3~21																	1	
2q21			2		2	2		5			8			15	3		7	
2q22			1								1							
2q23							1	2			1			3			2	
2q24														4				
2q31			1			3		4			7			14	4	1	10	1
2q32			2			4		1						3	4		6	
2q33			3			1		5			6			9	1		6	
2q34																		
2q35								5			1			4	1		5	
2q36																	1	
2q37			1			1		7			6			15	4		7	
2q37.1																		
2q37.2																		
2q37.3															1			
Summe	Σ 0	Σ 1	Σ 22	Σ 0	Σ 5	Σ 22	Σ 2	Σ 68	Σ 0	Σ 0	Σ 72	Σ 1	Σ 0	Σ 132	Σ 27	Σ 1	Σ 91	Σ 1
3p26			3			2					4			2	1		4	
3p25~26						1												
3p25		1	1					5			5			6	4		3	
3p24~25			1															
3p24		1	1					1						4	1		1	
3p23														4			1	
3p22~23														1				
3p22														1				
3p21~22														1				
3p21			3					12			15			16	2		18	1

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
3p14			26		1	42		2	1		5	1		3	26		6	
3p13								4			1			1				
3p11~12															1			
3p12											1			3			1	
3p11		2						4			3			5			2	
3q11.1								3			1			2				1
3q11.2								1			1							
3q11.2~12											1							
3q12					1			1			1			5	1			
3q13						2								3	1			
3q13.1											1							
3q13.2																		
3q13.3								2			1			2			1	
3q21								9			12	1		11	2		8	
3q21~22														1				
3q22																		
3q23								2						2			1	
3q23~24														1				
3q24								1										
3q25								2		1	1			11	3		7	
3q25~26											1							
3q26														2	1		1	
3q27			2			3		4						7			4	
3q28														1			1	
3q29								2			3			5			2	
Summe	Σ 0	Σ 4	Σ 37	Σ 0	Σ 2	Σ 50	Σ 0	Σ 55	Σ 1	Σ 1	Σ 57	Σ 2	Σ 0	Σ 100	Σ 43	Σ 0	Σ 61	Σ 2
4p16			3					1			10		1	11	1		5	
4p15~16											1							
4p15.3														3			1	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
4p15.2																		
4p15.1																		
4p15					1			6			2			4			4	
4p14								3			3	1		2				
4p13														1			1	
4p12									1					5			3	
4p11								3						8				
4q11								2						1			2	
4q11~12											1							
4q12								3			5			7	1		4	
4q13								1									3	
4q21			1			1		6			7			11			5	
4q22								1			1						1	
4q23											2				1			
4q24																		1
4q25						2		1			1			5			6	
4q26														1				
4q27								4			5			12	3		5	
4q28														1				
4q31			3			3		6	1		8			21	2		10	
4q31.1														1				
4q31.2																		
4q31.3														1			1	
4q32								2										
4q33								2			2			4				
4q34																		
4q34~35								1										
4q35								6			4	3		7	1		3	
4q35.1																	1	
Summe	Σ 0	Σ 0	Σ 7	Σ 0	Σ 1	Σ 6	Σ 0	Σ 48	Σ 2	Σ 0	Σ 52	Σ 4	Σ 1	Σ 106	Σ 9	Σ 0	Σ 55	Σ 1

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
5p15.3											1	1		4	1		2	
5p15.2														1				
5p15.1						1								2	1			
5p15			1					3			1			6			3	
5p14								3			1			2			3	
5p13~14														1				
5p13			2					3			2			7	1		5	
5p12~13														1				
5p12								2						1				
5p11						1		2				1		11			7	
5q11.1								3						1				
5q11.2								1	1					2	1		6	
5q11~12															1			
5q12														2			1	
5q13			1					6			7			7			4	
5q14														1				
5q15			2					2	1		2			8	2		2	
5q21								2						1			1	
5q22			1		1			3						3			9	
5q23.1											1							
5q23.2																		
5q23.3																		
5q31								4			8			12	1		15	1
5q31.1								1										
5q31.2																		
5q31.3		1																
5q32						2		2						3				
5q33						1		3			1			4			1	
5q34								1						2				
5q34~35											1							

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
5q35					1			6			2			2			3	
5q35.1																		
5q35.2																		
5q35.3								1						1				
Summe	Σ 0	Σ 1	Σ 7	Σ 0	Σ 2	Σ 5	Σ 0	Σ 48	Σ 2	Σ 0	Σ 27	Σ 2	Σ 0	Σ 85	Σ 8	Σ 0	Σ 62	Σ 1
6p25			1					1			2			4	4		3	
6p24						2												
6p23						1		1			5			5			6	
6p22								5			1			2			1	
6p21						1		6			8			9	1		7	
6p21.3																		
6p21.2											1							
6p21.1					1			1			1			1	1		1	
6p12								1						1				
6p11.2											2						1	
6p11.1																		
6p11		1				2			1					4			4	
6q11						1		4			2						1	
6q12								1			1			1			1	
6q13			1					2			2			11			6	
6q14~15																	1	
6q14											1						1	
6q15											2			2			2	
6q15~16																	1	
6q16																		
6q21		1	1		1	1		4			6			8	1		5	
6q22			1											5			3	
6q22.1																		
6q22.2														1				

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
6q22.3																		
6q23														7	1		7	
6q23~24																	1	
6q24																	1	
6q24~25											1							
6q25			1					2			1			3	2		1	
6q26			10			10		6			1			7	3		4	
6q26~27											1			1				
6q27			1								2			4	1		4	
Summe	Σ 0	Σ 2	Σ 16	Σ 0	Σ 2	Σ 18	Σ 0	Σ 34	Σ 1	Σ 0	Σ 40	Σ 0	Σ 0	Σ 76	Σ 14	Σ 0	Σ 62	Σ 0
7p22.3															1			
7p22		1	2					2			2			6	1		5	
7p21.3																	1	
7p21								2			1			4	1			
7p15.3																	1	
7p15.2																		
7p15.1																		
7p15								3			2			3	3		6	
7p14		1				1								5				
7p13								2			2			6			5	
7p12														1				
7p11.2														3				
7p11.1																		
7p11											2			5			4	
7q11.1								1						2			2	
7q11.2														1			2	
7q11.21														1				
7q11.22																		
7q11.23		1	2			1		4			12	1		17	2		10	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
7q21			1					1						4	1		1	
7q21.1																		
7q21.2																		
7q21.3														1	1			
7q22		1						5			3			9	1		7	
7q31			5			2		4						6	2			
7q31.1			3			1						1			2			
7q31.2						2												
7q31.3																		
7q31.3~32								2										
7q32			6			4		3		1	4			6	3		10	
7q33											1							
7q34						1		2			1	1		2	5		5	
7q34~35						1											1	
7q35								1										
7q36								5			3			9			5	
Summe	Σ 0	Σ 4	Σ 19	Σ 0	Σ 0	Σ 13	Σ 0	Σ 37	Σ 0	Σ 1	Σ 33	Σ 3	Σ 0	Σ 91	Σ 23	Σ 0	Σ 65	Σ 0
8p23.3														1				
8p23.2																		
8p23.1														1			1	
8p23			1		1			5			3			5			3	
8p22						1		2			1			1	1			
8p21.3																		
8p21.2																		
8p21.1																		
8p21								5			1			5			11	
8p12														2			1	
8p11.2								3			2		1	6	1		1	
8p11.1			1					2						6	1			

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
8q11.1						1		1			1			2			6	
8q11.2								1			3			2				
8q11.21																		
8q11.22																		
8q11.23																		
8q12		1									1			1				
8q13								3			2			11		1	5	
8q21									1					1			1	
8q21.1														1				
8q21.2																		
8q21.3														1				
8q22		1	3		1			7			3			5	2		2	
8q23								2						2				
8q24								3			2			4			2	
8q24.1			1		1			2						4	1		3	
8q24.2																		
8q24.3						1		3			5			3			2	
Summe	Σ 0	Σ 2	Σ 6	Σ 0	Σ 3	Σ 3	Σ 0	Σ 39	Σ 1	Σ 0	Σ 24	Σ 0	Σ 1	Σ 64	Σ 6	Σ 1	Σ 38	Σ 0
9p24			1			1				1	2			1	1		3	
9p23~24														1				
9p23								1						2			1	
9p22~23											1							
9p22								3			1			2	3		4	
9p21								2						4			2	
9p13								5			3			3	1		7	
9p12~13																	1	
9p11~12																	1	
9p12												1		2				
9p11	1							2			1			2			2	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
9q11		1						3						4			5	
9q12		5			2			6				1		8	1		5	
9q12~13		1						1						1				
9q13		1	1					15			5			10	1		7	
9q21		1									3			5				
9q22			2					2	1		10		1	11	2		9	
9q22.1															1			
9q22.2																		
9q22.3																		
9q31			1					2		5				1			3	
9q32		1	1			2		3			1			6	1		4	
9q33														1			1	
9q33~34			1															
9q34			2			1		7			7	1		7			3	
9q34.1								1						1			1	
9q34.2																		
9q34.3								2						2			5	
Summe	Σ 1	Σ 10	Σ 9	Σ 0	Σ 2	Σ 4	Σ 0	Σ 55	Σ 1	Σ 6	Σ 34	Σ 3	Σ 1	Σ 74	Σ 11	Σ 0	Σ 64	Σ 0
10p15		1	1					1			1			3	2		2	
10p14														2			1	
10p13~14														1				
10p13								2			5			4			1	
10p12								2			1			5				
10p11.2			1					3						9	1	1	1	
10p11.1								2						4	2		2	
10q11.1				1				1			1			2			1	
10q11.2								7			3			3			3	
10q21								1						1			2	
10q22			1					5			5			12	2		5	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
10q23			1					2				1		9	2		4	
10q23.1																		
10q23.2																		
10q23.3														1				
10q24								8			5			7	5		6	1
10q25											2			5			2	
10q25~26																	1	
10q26			1		2			3			6			15	2		10	
10q26.1														3				
10q26.2																		
10q26.3											1							
Summe	Σ 0	Σ 1	Σ 5	Σ 1	Σ 2	Σ 0	Σ 0	Σ 37	Σ 0	Σ 0	Σ 30	Σ 1	Σ 0	Σ 86	Σ 16	Σ 1	Σ 41	Σ 1
11p15								2			5				1		4	
11p15.5								1									2	
11p15.4																	1	
11p15.3																		
11p15.2																		
11p15.1					1	1		1						5			1	
11p14~15														1				
11p14		1	2					1						6	2		1	
11p13		2				1		4						3			2	
11p12								1			1			4		1		
11p11.2								11			4			6	1		3	
11p11.1						1		2						5			2	
11q11						1					1			3			2	
11q12								3			1						2	
11q13						1		8			9			10	2		16	
11q13~14														1				
11q14			2		1	3					3			3	5		2	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
11q14.1								1						1				
11q14.2																		
11q14.3																		
11q21														1	1			
11q22			1					2			2			2	1		3	
11q22~23																		
11q23								7			3			9	1		4	
11q23.1																	2	
11q23.2																		
11q23.3																	1	
11q24								1									1	
11q25											7			3			1	
Summe	Σ 0	Σ 3	Σ 5	Σ 0	Σ 2	Σ 8	Σ 0	Σ 45	Σ 0	Σ 0	Σ 36	Σ 0	Σ 0	Σ 63	Σ 14	Σ 1	Σ 50	Σ 0
12p13.3											1			1			2	
12p13.2																		
12p13.1														1	1		1	
12p13								4			5			7	1		4	
12p12~13.1																	1	
12p12								1						2			1	
12p11.2~12.1											1							
12p11.2								3			6			2			4	
12p11.2~11.1								2									1	
12p11.1											3			5				
12q11											2							
12q12								1			1			2			1	
12q13		2			1			8			11	1		9			2	
12q13~14											1							
12q14								2			2			3			5	
12q14~15											1							

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
12q15											3			2				
12q15~21														1				
12q21						1					4			3	1		1	
12q21~22											1							
12q22								1			2	1		7			7	
12q23					1													
12q24								1			1			1	1		2	
12q24.1		1	1					2		1	5			8	4		3	
12q24.2								2						2				
12q24.3		1			1			3			6	1		2			4	
12q24.31																		
12q24.32																		
12q24.33								1			1							
Summe	Σ 0	Σ 4	Σ 1	Σ 0	Σ 3	Σ 1	Σ 0	Σ 31	Σ 0	Σ 1	Σ 57	Σ 3	Σ 0	Σ 58	Σ 8	Σ 0	Σ 39	Σ 0
13p13		1						1						2			2	
13p12		1																
13p11.2																		
13p11.1																		
13q11																		
13q12			1		1			3			2			9	1		2	
13q13			1					2			1			2	1			
13q13~14														1				
13q14			2					5			11		1	13	3		5	
13q21			1			1					2			4			1	
13q22								3			6		2	7	2		1	
13q31								2			1			2	1			
13q32								2			3			12			2	1
13q33														1				
13q34		1				1		5						3			5	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
Summe	Σ 0	Σ 3	Σ 5	Σ 0	Σ 1	Σ 2	Σ 0	Σ 23	Σ 0	Σ 0	Σ 26	Σ 0	Σ 3	Σ 56	Σ 8	Σ 0	Σ 18	Σ 1
14p13																	2	
14p12										1	1							1
14p11.2																		
14p11.1																		
14q11.1																		
14q11.2								3			3			1			2	
14q12								1										
14q13			1					3			1			8	1		3	
14q21											1			2	2		1	
14q22		3	1		1			3			4			1			6	1
14q23								1						1				
14q24			4			3		7		1	8			12	5		4	
14q24.1																	1	
14q24.2																		
14q24.3					1										1		1	
14q31								1			1			1			2	
14q31~32								1										
14q32						1		2			2			4			2	
14q32.1											1			3			1	
14q32.2																		
14q32.3														1				
Summe	Σ 0	Σ 3	Σ 6	Σ 0	Σ 2	Σ 4	Σ 0	Σ 22	Σ 0	Σ 2	Σ 22	Σ 0	Σ 0	Σ 34	Σ 9	Σ 0	Σ 25	Σ 2
15p13								3			3			1			1	
15p12																		
15p11.2																		
15p11.1																		
15q11.1																		

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
15q11.2									1	1	1			4			1	
15q12																		
15q12~13											1							
15q13								3						3			2	
15q14											1				1	1		
15q15								4			3			7	1		8	
15q21								3			3			2			1	
15q22								4			12				1		6	
15q23														1	1			
15q24								3		1	3			8	1		4	
15q25					1			4						2				
15q26								2			2			3			1	
15q26.1														2				
15q26.2																		
15q26.3											1						4	
Summe	Σ 0	Σ 0	Σ 0	Σ 0	Σ 1	Σ 0	Σ 0	Σ 26	Σ 1	Σ 2	Σ 30	Σ 0	Σ 0	Σ 33	Σ 5	Σ 1	Σ 28	Σ 0
16p13.3								5		1	3			4			4	1
16p13.2														1				
16p13.1								3			1			5			3	
16p12														2	1			
16p11.2~12														1				
16p11.2					3			4			3			5			5	
16p11.1														5			2	
16q11.1		1						3			2			2			2	
16q11.2		2						2			1	1		2			2	
16q12											6			4			1	
16q12.1								6			1	1		9	2		8	
16q12.2																		
16q13											2			4			1	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
16q21																	2	
16q22		1	3			1		1			2			6	3		7	
16q23			18			32		2			2	2		5	14		1	
16q24			5					6			4			2	4		5	
Summe	Σ 0	Σ 4	Σ 26	Σ 0	Σ 3	Σ 33	Σ 0	Σ 32	Σ 0	Σ 1	Σ 27	Σ 4	Σ 0	Σ 57	Σ 24	Σ 0	Σ 43	Σ 1
17p13		1						8			3		1	12	1		8	
17p12								2						4			1	
17p11.2			1			1		5					1	4			1	
17p11.1														2				
17q11.1								2			1			1				
17q11.1~11.2					2													
17q11.2		1						4			3			4	1		2	
17q11.2~12								1										
17q12								4							1		2	
17q21						1		2			7			10	1		4	
17q21.1																		
17q21.2																		
17q21.3					1													
17q21.3~22					1													
17q22								2						1			2	
17q22~23											1			1				
17q23								4			2			8			4	
17q24								2						1			1	
17q25			2		1			7			2			8	1		13	
Summe	Σ 0	Σ 2	Σ 3	Σ 0	Σ 5	Σ 2	Σ 0	Σ 43	Σ 0	Σ 0	Σ 19	Σ 0	Σ 2	Σ 56	Σ 5	Σ 0	Σ 38	Σ 0
18p11.3						1		4			5				2		1	
18p11.32																	2	
18p11.31																		

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
18p11.2						1		2			1			3			4	
18p11.1			1		2			1						3				
18q11.1																	1	
18q11.2								2			3			2			5	
18q11.2~12.1														2				
18q12			1					3						2	1		1	
18q12.1																		
18q12.2																		
18q12.3																		
18q12.3~21			1			1												
18q12~21								1										
18q21			1					3			3			11			7	
18q21.1						1												
18q21.2																		
18q21.3																		
18q22								1						3			2	
18q23								4			3		1	5			3	1
Summe	Σ 0	Σ 0	Σ 4	Σ 0	Σ 2	Σ 4	Σ 0	Σ 21	Σ 0	Σ 0	Σ 15	Σ 0	Σ 1	Σ 31	Σ 3	Σ 0	Σ 26	Σ 1
19p13.3		1						3			1			8			9	
19p13.2								1			1							
19p13.1								1			1			4				
19p13								3						6	1		1	
19p12																	1	
19p11														3				
19q11														2				
19q12																	2	
19q13.1								3			1			3			6	
19q13.2																		

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
19q13.3								6			1			1			5	
19q13.4								2			1			3			2	
Summe	Σ 0	Σ 1	Σ 0	Σ 0	Σ 0	Σ 0	Σ 0	Σ 19	Σ 0	Σ 0	Σ 6	Σ 0	Σ 0	Σ 30	Σ 1	Σ 0	Σ 26	Σ 0
20p13					1			3			3			4	3		1	
20p12						1								1			2	
20p11.2								1			1			3			2	
20p11.1								1						2				
20q11.1														1				1
20q11.2			1					4			5			7			9	
20q12								1										
20q13											1			1				
20q13.1								2			3			7			4	
20q13.2														2			2	
20q13.3								2			2	1		5			3	
Summe	Σ 0	Σ 0	Σ 1	Σ 0	Σ 1	Σ 1	Σ 0	Σ 14	Σ 0	Σ 0	Σ 15	Σ 1	Σ 0	Σ 33	Σ 3	Σ 0	Σ 23	Σ 1
21p13								3						1			1	
21p12																		
21p11.2																		
21p11.1																		
21q11.1																		
21q11.2					1			4						2	1			
21q21						1								3	2		1	
21q22								2			3			1			1	
21q22.1								2						4				
21q22.2																		
21q22.3								2						1			2	
Summe	Σ 0	Σ 0	Σ 0	Σ 0	Σ 1	Σ 1	Σ 0	Σ 13	Σ 0	Σ 0	Σ 3	Σ 0	Σ 0	Σ 12	Σ 3	Σ 0	Σ 5	Σ 0

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
22p13								2			1							
22p12																		
22p11.2																		
22p11.1																		
22q11.1								2										
22q11.2					1			4						6			3	
22q12			1			1		1						2	4			
22q12~13											1							
22q13								2						4			1	
22q13.1		1	1										1	1			1	
22q13.2																		
22q13.3											2			4				
Summe	Σ 0	Σ 1	Σ 2	Σ 0	Σ 1	Σ 1	Σ 0	Σ 11	Σ 0	Σ 0	Σ 4	Σ 0	Σ 1	Σ 17	Σ 4	Σ 0	Σ 5	Σ 0
Xp22			18			12		2			4			2	7		1	
Xp22.3			1					1			3			3	6	1	6	
Xp22.2														1				
Xp22.1								4			1			9			1	
Xp21								3						4	1		2	
Xp11.4								3			4			4			1	
Xp11.3																	1	
Xp11.2						1		2			2			4	1		3	
Xp11.1				1				3			2			7			4	
Xq11.1		1	2		1						1			5	1		1	1
Xq11.2																	1	
Xq11~12								1										
Xq12														1			2	
Xq13			1					6			7			8	1		6	
Xq21							1	1						1			2	
Xq22		1	10			2		2			12			7	8		10	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
Xq22.1																		
Xq22.2																		
Xq22.3																		
Xq23								1						1				
Xq24											2		1	3			2	
Xq25								1						1				
Xq25~26														2				
Xq26	1	1						2			2			3			4	
Xq26~27											1			2				
Xq27								1			1		1	6	1		2	
Xq27~28														2			1	
Xq28								3			7			2			6	
Summe	Σ 1	Σ 3	Σ 32	Σ 1	Σ 1	Σ 15	Σ 1	Σ 36	Σ 0	Σ 0	Σ 49	Σ 0	Σ 2	Σ 78	Σ 26	Σ 1	Σ 56	Σ 1
Gesamt	2	57	228	2	58	207	4	868	9	17	746	25	16	1534	301	6	1036	14

Tab. 8.4: Übersicht zu vollständigen Chromosomenbrüchen. Anmerkung: Indizes: A = native Suspension, B = MMC-behandelte Suspension, C = Aph-behandelte Suspension.

Suspension	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1B}**	**FA_{2B}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{4B}**	**Summe**	**Prozentanteil**
Chromosom											
1	1		1		9		1	6	6	24	32,88
2			1		4			4		9	12,33
3				1				1		2	2,74
4								3		3	4,11
5					2			3	1	6	8,22
6						1		2		3	4,11
7					1	1		1	1	4	5,48
8								1	1	2	2,74
9					1				1	2	2,74
10								3		3	4,11
11	1				4				1	6	8,22
12								1	1	2	2,74
13											0
14	1									1	1,37
15					1					1	1,37
16											0
17								1		1	1,37
18											0
19											0
20											0
21											0
22					1					1	1,37
X		1							2	3	4,11
											0
Summe	3	1	2	1	23	2	1	26	14	73	100

Tab. 8.5: Kolokalisation der Bruchereignisse des MMC-behandelten FA-Materials zu FSs der einzelnen FA-Patienten.

FA-Patient	**Anteil der FA-assoziierten Chromatidbrüche in Kolokalisation zu FSs**		
	Kolokalisation	Potentielle Kolokalisation	Keine Kolokalisation
1	64,98%	17,05%	17,97%
2	62,06%	23,73%	14,21%
3	60,82%	22,62%	16,56%
4	61,87%	20,66%	17,47%

Tab. 8.6: Übersicht über die Häufigkeit der an Satellitenassoziationen beteiligten Chromosomen. Anmerkung: Indizes: A = native Suspension, B = MMC-behandelte Suspension, C = Aph-behandelte Suspension.

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{2A}**	**FA_{1A}**	**FA_{2A}**	**FA_{3A}**	**FA_{4A}**
Chromosom						
13	2	2	3	1	1	4
14	3	3	0	0	1	0
15	0	2	5	0	1	0
21	2	6	12	1	1	0
22	1	3	4	0	1	0
Suspension	**Ko_{1B}**	**Ko_{2B}**	**FA_{1B}**	**FA_{2B}**	**FA_{3B}**	**FA_{4B}**
Chromosom						
13	3	1	8	1	4	8
14	0	0	0	1	4	1
15	0	0	9	1	6	5
21	2	0	10	1	4	4
22	1	1	5	0	0	6
Suspension	**Ko_{1C}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1C}**	**FA_{2C}**	**FA_{3C}**	**FA_{4C}**
Chromosom						
13	8	5	4	4	10	5
14	4	6	1	4	9	3
15	4	2	3	3	19	3
21	12	6	6	3	5	6
22	4	5	2	6	2	6

Tab. 8.7: Übersicht über die Häufigkeit der an Reunionsfiguren beteiligten chromosomalen Regionen in den jeweiligen Suspensionen. Fortsetzung auf den folgenden Seiten.

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
1p36.3								8		1	7			6			3	
1p36.1											2			3			1	
1p34								2			3		1	3			1	
1p32			1					4			4			4			1	
1p22								1			1			2			2	
1p21														1				
1p13								1			2			2				
1p11														1			2	
1q11											1			1				
1q12		1			4			1						2				
1q21					1						5			5			3	
1q23														1				
1q25								1						3				
1q31								1										
1q32											2			5			1	
1q42								1			2			4	1			
1q44														2	1			
2p25			1					1			2	1					2	
2p24														1				

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
2p23											3			2			3	
2p22											1							
2p21								1			4							
2p15																	1	
2p13								1			1			3			1	
2p11								1						1				
2q11								1						1				
2q11.2								1										
2q13								1			3						2	
2q14.3																	1	
2q21											5			2			2	
2q23														1			1	
2q31								2			1			1	1		3	
2q32								1						1			2	
2q33								1						2			2	
2q35														1				
2q37								3			2			4			2	
3p26						1					3			1			1	
3p25								2			1			2	1			
3p24														1				
3p22														1				

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
3p21								6			7			5			3	
3p14			2						1		1						3	
3p13								1						1				
3p11											1							
3q11														1				
3q12											1			1				
3q13														1				
3q21								2			5						4	
3q23								1										
3q25														3			2	
3q26														1				
3q27			1					2						1			1	
3q29								2			1			5				
4p16											7			5			2	
4p15.3														1				
4p15								1			2			2				
4p13														1				
4p12									1									
4p11														1				
4q11														1				
4q12														2			1	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
4q21											5			3			1	
4q23											2							
4q25								1			1						3	1
4q26															1			
4q27								1			2			2			1	
4q31								2			3			7			2	
4q31.3																	1	
4q33											1			1				
4q35.1																	1	
4q35								1			1			3				
5p15								1			1						1	
5p15.3														1				
5p15.1														1				
5p14								1						1				
5p13			1											2				
5p12														1				
5p11								1				1		1				
5q11.2														1				
5q12															1			
5q13								1			4						1	
5q15								1			1			2			1	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
5q22																	2	
5q23.1											1							
5q31								2			4			3			3	
5q32								1										
5q33								1						1				
5q35								3			1							
6p25											2			2				
6p23											2			1			2	
6p22								1										
6p21						1		2			3			3			1	
6p11.2											1							
6q11.1								1										
6q13								1			1			3				
6q14											1						1	
6q21								1			1						1	
6q22														1				
6q22.2														1				
6q23														3			1	
6q25											1							
6q26			1			1		4			2						1	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
7p22		1						1			1			2			1	
7p21								2						1				
7p15											2			1			3	
7p14														2				
7p13								1						3			2	
7p11											1						2	
7q11.2																	1	
7q11.23								1			5			3			1	
7q21								1									1	
7q22											1			1			2	
7q31						1								2				
7q32								2			1			1			5	
7q34								2						1			2	
7q36											2			2				
8p23								4			1			6			2	
8p21														1			3	
8p12														1			1	
8p11.2								1						2				
8p11								1						2				
8q11																	1	
8q11.2														1				

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
8q12														1				
8q13								1			1			3			1	
8q22		1						3			1							
8q23														2				
8q24								2			2			1				
8q24.1														2			1	
8q24.3											2							
9p24										1	2						2	
9p22								2			1			1			1	
9p21								1										
9p13											1						5	
9p12												1					1	
9p11											1							
9q11														3				
9q12								2						4			2	
9q13								4			3						1	
9q21								1			1			4				
9q22											6			2			2	
9q32														1				
9q34			1					1			2	1		5			4	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
10p15											1			1			1	
10p13											1						1	
10p12											1			4				
10p11.2								1						1			1	
10p11														2				
10q11											1						1	
10q11.2								1			1			1				
10q22								1			3			4				
10q23														2	1		1	
10q24								2			2			1			1	
10q25														4			1	
10q26					2			2			3			8			3	
11p15.1														1				
11p15											2						3	
11p14														2				
11p13								1										
11p12														2		1		
11p11.2								3			1			1			1	
11p11.1								1										
11q11											1							
11q12											1							

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
11q13								4			5			4	2		5	
11q14											2						1	
11q22														1			1	
11q23								2			2			4			3	
11q25											5						1	
12p13.3																	1	
12p13											3			5			1	
12p12								1						1				
12p11.2								2			3						1	
12p11											1			1				
12q12								1			1							
12q13								2			4			4			1	
12q14																	1	
12q15								1										
12q21											2			1				
12q22								1			2			1			2	
12q24.1											3			4				
12q24.3		1			1			2			3	1		2			1	
13p13		1						1						2			2	
13p12																		

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
13q12					1			1			1			4			1	
13q13								1						1				
13q14								1			6			5	1		1	
13q21								1										
13q22								1			2			2				
13q31											1							
13q32								1			1			2				
13q34		1						1									2	
14p13										1							2	
14p12											1							1
14q11.2																	1	
14q12								1										
14q13														4				
14q21														2				
14q22											2						1	
14q23														1				
14q24								1			3			3	1		1	
14q31														1				
14q32								1						2			1	
14q32.1											1							
14q32.3														1				

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
15p13								3			3			1			1	
15q12											1							
15q13								1						1			1	
15q14																1		
15q15											1			1			3	
15q21								1			1			1				
15q22								1			3						2	
15q23														1				
15q24											2			3			1	
15q25								2						1				
15q26								1			1			3			3	
16p13.3								4		1	3			1			2	1
16p13.1								2										
16p12														1				
16p11														1				
16p11.2					1			2			1			1			1	
16q11								2						1				
16q11.1																		
16q11.2		1																
16q12											1							
16q12.1								1						3			3	

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
16q13											1			1				
16q22														2				
16q23			1			1		2			1							
16q24								5			3				1		4	
17p13.3								1									2	
17p13								2						4			1	
17p11.2								1						2				
17p11														1				
17q11.1					2			1			1							
17q11.2								4			1			2	1			
17q21								1			3			5			1	
17q21.3~22					1													
17q22								1						1				
17q23								1			2			2				
17q24								1									1	
17q25											2		1	2			6	
18p11.3								2			1						3	
18p11.2								1						2				
18p11.1					2													
18p11								1						1				

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
18q11.2								1			2			1			1	
18q12								1										
18q21											1			5				
18q22														1			1	
18q23								1			2			1			3	1
19p13.3								2			1			1			4	
19p13.2								1			1							
19p13.1								1						2				
19p13								1						3			2	
19p11														1				
19q11														1				
19q12																	1	
19q13.1								2						1			1	
19q13.3								1			1			1			2	
19q13.4								1			1			1			2	
20p13								1						3			1	
20p11.2																	1	
20p11														1				
20q11.2								1			2			3			2	
20q13														1				

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
20q13.1								1			2							
20q13.2																		
20q13.3								1			2	1		3			2	
21p13								3						1			1	
21q11.2					1			1						1				
21q21														1			1	
21q22								1			2						1	
21q22.1								1						2				
21q22.3								2									1	
22p13								2			1							
22q11.2								1						3			3	
22q12											1			1				
22q13														1				
22q13.3											1			1				
Xp22.3											1			1	1		3	
Xp22.1														2				
Xp22			1			1		1			3			1			1	
Xp21														1				
Xp11.4								1			2			2				

Suspension	**Ko_{1A}**	**Ko_{1B}**	**Ko_{1C}**	**Ko_{2A}**	**Ko_{2B}**	**Ko_{2C}**	**FA_{1A}**	**FA_{1B}**	**FA_{1C}**	**FA_{2A}**	**FA_{2B}**	**FA_{2C}**	**FA_{3A}**	**FA_{3B}**	**FA_{3C}**	**FA_{4A}**	**FA_{4B}**	**FA_{4C}**
Region																		
Xp11.2														1				
Xp11														2				
Xq11														3				
Xq12														1				
Xq13			1					1			2			2				
Xq21														1			1	
Xq22		1	1					1			8			5			4	
Xq26								1			2			1			1	
Xq28								2			6			2			1	

Tab. 8.8: Übersicht zu den Hybridisierungsergebnissen von FRA1G innerhalb der vier MMC-behandelten FA-Suspensionen. Die Grenzen des Bruchpunktes stimmen bei allen vier FA-Patienten überein. Fortsetzung auf der folgenden Seite.

Suspension	**BAC**	**Proximal**	**Proximaler Bp**	**Innerhalb**	**Distaler Bp**	**Distal**
FA_{1B}						
	RP1-206D15	2	2			
	RP1-97P20		2			
	RP11-277C14	1	4	1	1	
	RP11-354H16					
	RP11-160H22					
	RP11-415M14					
	RP5-1026E2		2	4		
	RP11-254N18			2	2	1
	RP11-382D12					1
Suspension	**BAC**	**Proximal**	**Proximaler Bp**	**Innerhalb**	**Distaler Bp**	**Distal**
FA_{2B}	RP1-206D15	3				
	RP1-97P20		2			
	RP11-277C14					
	RP11-354H16					
	RP11-160H22					
	RP11-415M14					
	RP5-1026E2					
	RP11-254N18				2	
	RP11-382D12					2

Suspension	BAC	Proximal	Proximaler Bp	Innerhalb	Distaler Bp	Distal
FA_{3B}	RP1-206D15	3	1			
	RP1-97P20		5			
	RP11-277C14					
	RP11-354H16		5	4	2	
	RP11-160H22		3	3	4	
	RP11-415M14		1	3	3	
	RP5-1026E2					
	RP11-254N18			3	2	3
	RP11-382D12				3	3
Suspension	**BAC**	**Proximal**	**Proximaler Bp**	**Innerhalb**	**Distaler Bp**	**Distal**
FA_{4B}	RP1-206D15	1				
	RP1-97P20		1			
	RP11-277C14					
	RP11-354H16	1	1	1		
	RP11-160H22				1	
	RP11-415M14		1	2	2	
	RP5-1026E2					
	RP11-254N18			1	1	1
	RP11-382D12					

a) Summary: FRA1B – proximaler Grenzbereich

```
==============================================
file name: RM2sequpload_1371026843
sequences:              1
total length:      761566 bp  (761566 bp excl N/X-runs)
GC level:          44.74 %
bases masked:      425282 bp ( 55.71 %)
==============================================
                 number of      length   percentage
                 elements*    occupied  of sequence
----------------------------------------------
SINEs:               700      147701 bp   18.31 %
     ALUs            320       85356 bp   11.35 %
     MIRs            414       62318 bp    7.79 %

LINEs:               361      156337 bp   20.37 %
     LINE1           111       89382 bp   11.48 %
     LINE2           215       62245 bp    7.96 %
     L3/CR1           30        4222 bp    0.54 %

LTR elements:        145       91385 bp   11.76 %
     ERVL             30       13219 bp    1.69 %
     ERVL-MaLRs       76       31757 bp    4.06 %
     ERV_classI       29       44418 bp    5.68 %
     ERV_classII       1         990 bp    0.13 %

DNA elements:        140       31056 bp    3.97 %
    hAT-Charlie       70       12318 bp    1.58 %
    TcMar-Tigger      34       13554 bp    1.73 %

Unclassified:          2         288 bp    0.04 %

Total interspersed repeats:   427357 bp   54.74 %


Small RNA:             6         304 bp    0.10 %

Satellites:            0           0 bp    0.00 %
Simple repeats:      125        6387 bp    0.81 %
Low complexity:       19         308 bp    0.10 %
==============================================
```

b) Summary: FRA1B - Zentrum

```
==============================================
file name: RM2_sequenz.txt_1370213802
sequences:              1
total length:     5513302 bp  (5513302 bp excl N/X-runs)
GC level:         48.30 %
bases masked:     2959548 bp ( 53.68 %)
==============================================
                 number of      length   percentage
                 elements*    occupied  of sequence

SINEs:              4031      759313 bp   13.77 %
     ALUs           1030      282702 bp    5.13 %
     MIRs           2955      476363 bp    8.64 %

LINEs:              2726     1351525 bp   24.51 %
     LINE1           877      861586 bp   15.63 %
     LINE2          1617      422450 bp    7.66 %
     L3/CR1          131       37715 bp    0.68 %

LTR elements:       1136      563593 bp   10.22 %
     ERVL            337      162275 bp    2.94 %
     ERVL-MaLRs      651      290211 bp    5.26 %
     ERV_classI      124       85170 bp    1.54 %
     ERV_classII       9        6136 bp    0.11 %

DNA elements:        948      222994 bp    4.04 %
    hAT-Charlie      545      104948 bp    1.90 %
    TcMar-Tigger     151       74097 bp    1.34 %

Unclassified:         30        4700 bp    0.08 %

Total interspersed repeats:   2882163 bp   52.28 %


Small RNA:            15        1689 bp    0.03 %

Satellites:            0           0 bp    0.00 %
Simple repeats:     1272       56569 bp    1.21 %
Low complexity:      173       11487 bp    0.21 %
==============================================
```

c) Summary: FRA1B - distaler Grenzbereich

```
==============================================
file name: RM2sequpload_1371026947
sequences:              1
total length:     1083162 bp  (1083162 bp excl N/X-runs)
GC level:         40.11 %
bases masked:     479114 bp ( 44.23 %)
==============================================
                 number of      length   percentage
                 elements*    occupied  of sequence
----------------------------------------------
SINEs:               946      217163 bp   20.05 %
     ALUs            635      168922 bp   15.60 %
     MIRs            309       48072 bp    4.44 %

LINEs:               381      152504 bp   14.08 %
     LINE1           131       93842 bp    8.66 %
     LINE2           213       50091 bp    4.62 %
     L3/CR1           29        6445 bp    0.60 %

LTR elements:        139       59577 bp    5.50 %
     ERVL             26       16329 bp    1.51 %
     ERVL-MaLRs       75       29677 bp    2.74 %
     ERV_classI       29       10942 bp    1.01 %
     ERV_classII       0           0 bp    0.00 %

DNA elements:        160       35477 bp    3.28 %
    hAT-Charlie       82       18428 bp    1.70 %
    TcMar-Tigger      40       10058 bp    0.93 %

Unclassified:          3         416 bp    0.04 %

Total interspersed repeats:   465137 bp   42.94 %


Small RNA:             2         200 bp    0.02 %

Satellites:            0           0 bp    0.00 %
Simple repeats:      286       12263 bp    1.13 %
Low complexity:       33        1633 bp    0.15 %
==============================================
```

Abb. 8.3a-c: Darstellung der Ergebnisse der Sequenz-Analyse von FRA1B mittels „cross_match“-Suchalgorithmus (Version 1.080812). a: proximaler Grenzbereich, b: Zentrum, c: distaler Grenzbereich.

a) Summary: FRA1D - proximaler Grenzbreich

```
file name: RM2sequpload_1371038611
sequences:                1
total length:      641409 bp  (641409 bp excl N/X-runs)
GC level:          39.40 %
bases masked:      275489 bp ( 42.95 %)
```

	number of elements*	length occupied	percentage of sequence
SINEs:	323	69381 bp	10.82 %
ALUs	143	39437 bp	6.15 %
MIRs	174	29195 bp	4.55 %
LINEs:	209	112936 bp	17.61 %
LINE1	81	78905 bp	12.30 %
LINE2	110	29135 bp	4.54 %
L3/CR1	16	4317 bp	0.67 %
LTR elements:	121	58436 bp	9.11 %
ERVL	26	11753 bp	1.83 %
ERVL-MaLRs	69	34219 bp	5.33 %
ERV_classI	16	9781 bp	1.52 %
ERV_classII	0	0 bp	0.00 %
DNA elements:	109	26654 bp	4.16 %
hAT-Charlie	38	9952 bp	1.55 %
TcMar-Tigger	29	10392 bp	1.62 %
Unclassified:	5	587 bp	0.09 %
Total interspersed repeats:		267994 bp	41.78 %
Small RNA:	3	436 bp	0.07 %
Satellites:	0	0 bp	0.00 %
Simple repeats:	150	6131 bp	0.96 %
Low complexity:	29	1552 bp	0.24 %

b) Summary: FRA1D - Zentrum

```
file name: RM2sequpload_1371038196
sequences:                1
total length:     3368120 bp  (3368120 bp excl N/X-runs)
GC level:          38.82 %
bases masked:     1747140 bp ( 51.87 %)
```

	number of elements*	length occupied	percentage of sequence
SINEs:	1605	357421 bp	10.61 %
ALUs	907	243985 bp	7.24 %
MIRs	683	110743 bp	3.29 %
LINEs:	1230	874204 bp	25.96 %
LINE1	594	690620 bp	20.50 %
LINE2	532	158110 bp	4.69 %
L3/CR1	81	19758 bp	0.59 %
LTR elements:	585	338668 bp	10.06 %
ERVL	130	88528 bp	2.63 %
ERVL-MaLRs	303	135307 bp	4.02 %
ERV_classI	121	98621 bp	2.93 %
ERV_classII	8	10696 bp	0.32 %
DNA elements:	504	129925 bp	3.86 %
hAT-Charlie	243	51738 bp	1.54 %
TcMar-Tigger	101	40303 bp	1.20 %
Unclassified:	23	6015 bp	0.18 %
Total interspersed repeats:		1706233 bp	50.66 %
Small RNA:	15	2082 bp	0.06 %
Satellites:	0	0 bp	0.00 %
Simple repeats:	717	33751 bp	1.00 %
Low complexity:	113	6814 bp	0.20 %

c) Summary: FRA1D – distaler Grenzbereich

```
file name: RM2sequpload_1371038904
sequences:                1
total length:      972377 bp  (972377 bp excl N/X-runs)
GC level:          40.26 %
bases masked:      524734 bp ( 53.96 %)
```

	number of elements*	length occupied	percentage of sequence
SINEs:	737	174946 bp	17.99 %
ALUs	557	147854 bp	15.21 %
MIRs	176	26624 bp	2.74 %
LINEs:	323	213764 bp	21.98 %
LINE1	158	157389 bp	16.19 %
LINE2	144	51832 bp	5.33 %
L3/CR1	16	3911 bp	0.40 %
LTR elements:	162	88806 bp	9.13 %
ERVL	42	27356 bp	2.81 %
ERVL-MaLRs	71	29480 bp	3.03 %
ERV_classI	33	26112 bp	2.69 %
ERV_classII	4	3026 bp	0.31 %
DNA elements:	138	31840 bp	3.27 %
hAT-Charlie	62	12724 bp	1.31 %
TcMar-Tigger	33	11836 bp	1.22 %
Unclassified:	5	3264 bp	0.34 %
Total interspersed repeats:		512620 bp	52.72 %
Small RNA:	11	1361 bp	0.14 %
Satellites:	0	0 bp	0.00 %
Simple repeats:	197	9456 bp	0.97 %
Low complexity:	34	1643 bp	0.17 %

Abb. 8.4a-c: Darstellung der Ergebnisse der Sequenz-Analyse von FRA1D mittels „cross_match“-Suchalgorithmus (Version 1.080812). a: proximaler Grenzbereich, b: Zentrum, c: distaler Grenzbereich.

a)Summary: FRA1F – proximaler Grenzbereich

```
file name: RM2sequpload_1372075861
sequences:            1
total length:    1102676 bp  (952676 bp excl N/X-runs)
GC level:         41.41 %
bases masked:     479292 bp ( 43.47 %)
```

	number of elements*	length occupied	percentage of sequence
SINEs:	484	108617 bp	9.85 %
ALUs	331	84996 bp	7.71 %
MIRs	144	22223 bp	2.02 %
LINEs:	353	277424 bp	25.16 %
LINE1	245	242556 bp	22.00 %
LINE2	86	25955 bp	2.35 %
L3/CR1	18	7303 bp	0.66 %
LTR elements:	110	59260 bp	5.37 %
ERVL	23	8573 bp	0.78 %
ERVL-MaLRs	42	19561 bp	1.77 %
ERV_classI	31	21850 bp	1.98 %
ERV_classII	10	8845 bp	0.80 %
DNA elements:	80	17594 bp	1.60 %
hAT-Charlie	42	7303 bp	0.66 %
TcMar-Tigger	18	7484 bp	0.68 %
Unclassified:	3	3393 bp	0.31 %
Total interspersed repeats:		466288 bp	42.29 %
Small RNA:	26	2253 bp	0.20 %
Satellites:	0	0 bp	0.00 %
Simple repeats:	232	9521 bp	0.86 %
Low complexity:	21	1382 bp	0.13 %

b)Summary: FRA1F - Zentrum

```
file name: RM2sequpload_1372103807
sequences:            1
total length:    6967021 bp  (6517021 bp excl N/X-runs)
GC level:         43.15 %
bases masked:    3274696 bp ( 47.00 %)
```

	number of elements*	length occupied	percentage of sequence
SINEs:	5079	1222742 bp	17.55 %
ALUs	3975	1056595 bp	15.17 %
MIRs	1077	163160 bp	2.34 %
LINEs:	2127	1240194 bp	17.80 %
LINE1	1215	981206 bp	14.08 %
LINE2	757	225273 bp	3.23 %
L3/CR1	130	25755 bp	0.37 %
LTR elements:	922	501456 bp	7.20 %
ERVL	197	98826 bp	1.42 %
ERVL-MaLRs	320	136429 bp	1.96 %
ERV_classI	349	229237 bp	3.29 %
ERV_classII	28	29651 bp	0.43 %
DNA elements:	708	177440 bp	2.55 %
hAT-Charlie	381	74166 bp	1.06 %
TcMar-Tigger	174	77697 bp	1.12 %
Unclassified:	27	29146 bp	0.42 %
Total interspersed repeats:		3170978 bp	45.51 %
Small RNA:	136	13726 bp	0.20 %
Satellites:	2	1264 bp	0.02 %
Simple repeats:	1632	74061 bp	1.06 %
Low complexity:	266	15544 bp	0.22 %

c)Summary: FRA1F – distaler Grenzbereich

```
file name: RM2sequpload_1371046569
sequences:            1
total length:     229463 bp  (229463 bp excl N/X-runs)
GC level:         45.89 %
bases masked:     134255 bp ( 58.51 %)
```

	number of elements*	length occupied	percentage of sequence
SINEs:	251	91455 bp	39.86 %
ALUs	321	87050 bp	37.94 %
MIRs	29	4196 bp	1.83 %
LINEs:	43	24589 bp	10.72 %
LINE1	27	20634 bp	8.99 %
LINE2	14	3716 bp	1.62 %
L3/CR1	2	239 bp	0.10 %
LTR elements:	6	9073 bp	3.95 %
ERVL	2	1493 bp	0.65 %
ERVL MaLRs	2	647 bp	0.28 %
ERV_classI	1	682 bp	0.30 %
ERV_classII	1	6251 bp	2.72 %
DNA elements:	19	4934 bp	2.15 %
hAT-Charlie	7	2327 bp	1.01 %
TcMar-Tigger	7	1737 bp	0.76 %
Unclassified:	0	0 bp	0.00 %
Total interspersed repeats:		130051 bp	56.68 %
Small RNA:	5	300 bp	0.13 %
Satellites:	0	0 bp	0.00 %
Simple repeats:	69	2859 bp	1.22 %
Low complexity:	15	845 bp	0.37 %

Abb. 8.5a-c: Darstellung der Ergebnisse der Sequenz-Analyse von FRA1F mittels „cross_match“-Suchalgorithmus (Version 1.080812). a: proximaler Grenzbereich, b: Zentrum, c: distaler Grenzbereich.

a) Summary: FRA1G – proximaler Grenzbereich

```
==================================================
file name: RM2sequpload_1372247954
sequences:             1
total length:    2081098 bp  (2081098 bp excl N/X-runs)
GC level:         38.61 %
bases masked:    1162101 bp ( 55.84 %)
==================================================
                number of      length   percentage
                elements*    occupied  of sequence
--------------------------------------------------
SINEs:             1073       240757 bp   11.57 %
      ALUs          685       180917 bp    8.69 %
      MIRs          378        58826 bp    2.83 %

LINEs:              754       570619 bp   27.42 %
      LINE1         403       470923 bp   22.63 %
      LINE2         277        87274 bp    4.19 %
      L3/CR1         49         8249 bp    0.40 %

LTR elements:       383       231885 bp   11.14 %
      ERVL           74        37474 bp    1.80 %
      ERVL-MaLRs    175        84211 bp    4.05 %
      ERV_classI     97        94491 bp    4.54 %
      ERV_classII     7         4470 bp    0.21 %

DNA elements:       322        90676 bp    4.36 %
     hAT-Charlie    156        34909 bp    1.68 %
     TcMar-Tigger    93        35343 bp    1.70 %

Unclassified:         7         4265 bp    0.20 %

Total interspersed repeats:  1138202 bp   54.69 %


Small RNA:           13         1959 bp    0.09 %

Satellites:           0            0 bp    0.00 %
Simple repeats:     435        18423 bp    0.89 %
Low complexity:      57         3736 bp    0.18 %
==================================================
```

b) Summary: FRA1G – Zentrum

```
==================================================
file name: RM2sequpload_1372247907
sequences:             1
total length:    5429265 bp  (5429265 bp excl N/X-runs)
GC level:         39.66 %
bases masked:    2871050 bp ( 52.88 %)
==================================================
                number of      length   percentage
                elements*    occupied  of sequence
--------------------------------------------------
SINEs:             2846       627952 bp   11.57 %
      ALUs         1662       445268 bp    8.20 %
      MIRs         1131       176447 bp    3.25 %

LINEs:             1970      1432601 bp   26.39 %
      LINE1         923      1100207 bp   20.26 %
      LINE2         861       281852 bp    5.19 %
      L3/CR1        147        41720 bp    0.77 %

LTR elements:       845       511595 bp    9.42 %
      ERVL          145        88338 bp    1.63 %
      ERVL-MaLRs    393       175276 bp    3.23 %
      ERV_classI    224       214888 bp    3.96 %
      ERV_classII    12        10059 bp    0.19 %

DNA elements:       875       215987 bp    3.98 %
     hAT-Charlie    470       102143 bp    1.88 %
     TcMar-Tigger   187        73314 bp    1.35 %

Unclassified:        39        14816 bp    0.27 %

Total interspersed repeats:  2802951 bp   51.63 %


Small RNA:           32         3015 bp    0.06 %

Satellites:           0            0 bp    0.00 %
Simple repeats:    1223        56350 bp    1.04 %
Low complexity:     174         9465 bp    0.17 %
==================================================
```

c) Summary: FRA1G – distaler Grenzbereich

```
==================================================
file name: RM2sequpload_1371119804
sequences:             1
total length:    3144076 bp  (3144076 bp excl N/X-runs)
GC level:         40.56 %
bases masked:    1688100 bp ( 53.69 %)
==================================================
                number of      length   percentage
                elements*    occupied  of sequence
--------------------------------------------------
SINEs:             2080       484758 bp   15.42 %
      ALUs         1434       384809 bp   12.24 %
      MIRs          627        97475 bp    3.10 %

LINEs:             1205       831645 bp   26.45 %
      LINE1         619       654708 bp   20.82 %
      LINE2         498       155113 bp    4.93 %
      L3/CR1         67        15663 bp    0.50 %

LTR elements:       366       193317 bp    6.15 %
      ERVL           64        34931 bp    1.11 %
      ERVL-MaLRs    197        84011 bp    2.67 %
      ERV_classI     70        52088 bp    1.66 %
      ERV_classII     7        15015 bp    0.48 %

DNA elements:       503       134642 bp    4.28 %
     hAT-Charlie    241        54003 bp    1.72 %
     TcMar-Tigger   136        56003 bp    1.78 %

Unclassified:        25         8456 bp    0.27 %

Total interspersed repeats:  1652818 bp   52.57 %


Small RNA:           17         1720 bp    0.05 %

Satellites:           0            0 bp    0.00 %
Simple repeats:     654        30050 bp    0.96 %
Low complexity:      86         5026 bp    0.16 %
==================================================
```

Abb. 8.6a-c: Darstellung der Ergebnisse der Sequenz-Analyse von FRA1G mittels „cross_match“-Suchalgorithmus (Version 1.080812). a: proximaler Grenzbereich, b: Zentrum, c: distaler Grenzbereich.

a) Summary: FRA1K – proximaler Grenzbereich

```
==================================================
file name: RM2sequpload_1371126064
sequences:             1
total length:    1948192 bp  (1948192 bp excl N/X-runs)
GC level:         34.56 %
bases masked:    1077008 bp ( 55.28 %)
==================================================
                number of      length   percentage
                elements*    occupied  of sequence
--------------------------------------------------
SINEs:              521       117865 bp    6.05 %
      ALUs          326        87572 bp    4.50 %
      MIRs          191        29759 bp    1.53 %

LINEs:              683       605164 bp   31.06 %
      LINE1         462       523464 bp   26.87 %
      LINE2         177        71894 bp    3.69 %
      L3/CR1         30         7020 bp    0.36 %

LTR elements:       437       245449 bp   12.60 %
      ERVL          122        68215 bp    3.50 %
      ERVL-MaLRs    200       113209 bp    5.81 %
      ERV_classI     88        54026 bp    2.77 %
      ERV_classII     4         4202 bp    0.22 %

DNA elements:       230        75077 bp    3.85 %
     hAT-Charlie    107        29560 bp    1.52 %
     TcMar-Tigger    63        31611 bp    1.62 %

Unclassified:         7         1525 bp    0.08 %

Total interspersed repeats:  1045080 bp   53.64 %


Small RNA:            4          459 bp    0.02 %

Satellites:           1         1040 bp    0.05 %
Simple repeats:     467        25784 bp    1.32 %
Low complexity:      89         5703 bp    0.29 %
==================================================
```

b) Summary: FRA1K – Zentrum

```
==================================================
file name: RM2sequpload_1371126225
sequences:             1
total length:    9753168 bp  (9753168 bp excl N/X-runs)
GC level:         38.22 %
bases masked:    4843616 bp ( 49.66 %)
==================================================
                number of      length   percentage
                elements*    occupied  of sequence
--------------------------------------------------
SINEs:             4849      1116584 bp   11.45 %
      ALUs         3131       844906 bp    8.66 %
      MIRs         1683       267029 bp    2.74 %

LINEs:             3465      2351050 bp   24.11 %
      LINE1        1912      1846480 bp   18.93 %
      LINE2        1286       438772 bp    4.50 %
      L3/CR1        200        47218 bp    0.48 %

LTR elements:      1610       849131 bp    8.71 %
      ERVL          399       222725 bp    2.28 %
      ERVL-MaLRs    787       364140 bp    3.73 %
      ERV_classI    326       228491 bp    2.34 %
      ERV_classII    21        14166 bp    0.15 %

DNA elements:      1295       360092 bp    3.69 %
     hAT-Charlie    663       145761 bp    1.49 %
     TcMar-Tigger   319       155272 bp    1.59 %

Unclassified:        36        13830 bp    0.14 %

Total interspersed repeats:  4690687 bp   48.09 %


Small RNA:           32         3256 bp    0.03 %

Satellites:           0            0 bp    0.00 %
Simple repeats:    2575       132998 bp    1.36 %
Low complexity:     351        20276 bp    0.21 %
==================================================
```

c) Summary: FRA1K – distaler Grenzbereich

```
==================================================
file name: RM2sequpload_1371126029
sequences:             1
total length:     530521 bp  (530521 bp excl N/X-runs)
GC level:         43.58 %
bases masked:     227937 bp ( 42.96 %)
==================================================
                number of      length   percentage
                elements*    occupied  of sequence
--------------------------------------------------
SINEs:              476       109178 bp   20.58 %
      ALUs          327        86043 bp   16.22 %
      MIRs          144        22444 bp    4.23 %

LINEs:              197        79914 bp   15.06 %
      LINE1          84        45028 bp    8.49 %
      LINE2          88        30710 bp    5.79 %
      L3/CR1         22         3754 bp    0.71 %

LTR elements:         34        11942 bp    2.25 %
      ERVL             1          358 bp    0.07 %
      ERVL-MaLRs      19         6260 bp    1.18 %
      ERV_classI      12         5111 bp    0.96 %
      ERV_classII      1           80 bp    0.02 %

DNA elements:         82        17071 bp    3.22 %
     hAT-Charlie      61        12763 bp    2.41 %
     TcMar-Tigger     14         3587 bp    0.68 %

Unclassified:         4         2763 bp    0.52 %

Total interspersed repeats:   220868 bp   41.63 %


Small RNA:            1          103 bp    0.02 %

Satellites:           0            0 bp    0.00 %
Simple repeats:     126         6372 bp    1.20 %
Low complexity:      13          728 bp    0.14 %
==================================================
```

Abb. 8.7a-c: Darstellung der Ergebnisse der Sequenz-Analyse von FRA1K mittels „cross_match“-Suchalgorithmus (Version 1.080812). a: proximaler Grenzbereich, b: Zentrum, c: distaler Grenzbereich.

Tab. 8.9: Tumor-assoziierte Gene innerhalb FRA1B. Anmerkung: ↑ = Steigerung, ↓ = Verminderung. Daten aus http://atlasgeneticsoncology.org.

Gen	Start (bp)	Stop (bp)	Funktion	Tumor und Expression	Referenz
NRD1	52254866	52344609	Zellmigration, Zellproliferation	Mamma-Ca (↑ Expression)	Choong *et al.* 2011
GPX7	53068043	53074723	Protektion vor oxidativen DNA-Schäden	Ösophageales Adeno-Ca (↓ Expression)	Peng *et al.* 2012
DIO1	54359861	54376759	Thyroxindeiodinase, Zellproliferation, Zelldifferenzierung	Klarzelliges Nieren-Ca, papilläres Schilddrüsen-Ca (↓Expression); Mamma-Ca (↑ Expression)	Casula und Bianco 2012
HSPB11 (Hsp16.2)	54387234	54411288	Apoptoseregulation	Gehirn-Tumore (↑ Expression)	Bellyei *et al.* 2007, Pozsgai *et al.* 2007
TTC4	55181495	55208328	Replikationsregulation	Melanom, u.a. (z.T. Deletionen, ↓ Expression)	Crevel *et al.* 2008
DHCR24	55315300	55352921	Mediator Ras-induzierter Seneszenz, Apoptoseregulation	Nebennieren-Ca, Prostata-Ca (↓ Expression)	Battista *et al.* 2010, Luciani *et al.* 2004
PPAP2B (LPP3)	56960419	57045257	Regulation des Wnt-Signalwegs (Proliferation)	Glioblastom (↑ Expression), Lipom: t(1;12)(p32;q14), Fusionsgen: *HMGA2-LPP*	Bianchini *et al.* 2013
DAB1	57463579	58716211	Unklar	Gehirn-Tumoren, Endometrium-Ca (↓ Expression)	McAvoy *et al.* 2008
TACSTD2	59041095	59043166	Zellproliferation	Mamma-Ca, HNSCC u.a. (↑ Expression)	Fong *et al.* 2008, Lin *et al.* 2013
JUN	59246463	59249785	reguliert G/S-Phase-Checkpoint	Sarkome, Morbus Hodgkin (↑ Expression)	Shaulian 2010
CYP2J2	60358980	60392423	Zellproliferation via JNK-Pathway u.a.	AML (↑ Expression)	Chen *et al.* 2011

Tab. 8.10: Tumor-assoziierte Gene innerhalb FRA1D. Anmerkung: ↑ = Steigerung, ↓ = Verminderung. Daten aus http://atlasgeneticsoncology.org.

Gen	Start (bp)	Stop (bp)	Funktion	Tumor und Expression	Referenz
LPAR3	85279086	85358896	Zellproliferation, Zellmigration	Mamma-Ca (↑ Expression)	Popnikolov *et al.* 2012
BCL10	85731460	85742587	Apoptoseregulation	u.a. MALT- Lymphome: t(1;14)(p22;q32), (↑ Expression mutanten Typs)	Hosoda *et al.* 2013
CYR61	86046444	86049648	Zellproliferation,Zellmigration	u.a. Mamma-Ca, Prostata-Ca (↑ Expression)	Chong *et al.* 2012
CLCA2	86889769	86922240	Apoptoseregualtion	Mantelzell-Lymphom (Deletion, ↓ Expression)	Balakrishnan *et al.* 2006
CLCA1	86934526	86965974	Zellproliferation, Zelldifferenzierung	Kolorektale Ca (↓ Expression)	Yang *et al.* 2013a
Bif-1	87170253	87213867	Apoptoseregulation, Autophagieregulation	u.a. Kolorektale Ca, Prostata-Ca, Lymphome (↓ Expression)	Takahashi *et al.* 2013
SEP15	87328128	87380107	Redoxaktivität, Proteinfaltung	u.a. Prostata-Ca, Mesotheliom (↓ Expression)	Davis *et al.* 2012
LMO4	87794151	87814607	Zellproliferation	u.a. Mamma-Ca, (↑ Expression)	Stokes *et al.* 2013
PKN2	89149922	89301938	Zellmigration, Zellinvasion	Harnblasen-Ca (↑ Expression)	Lachmann *et al.* 2011
GBP1	89517987	89531043	Apoptoseregulation	Kolorektale Ca (↓ Expression)	Britzen-Laurent *et al.* 2013
GBP2	89573310	89591799	mglw. Zellproliferation	Ösophageale Plattenepithel-Ca (↑ Expression)	Guimarães *et al.* 2009
GBP5	89724634	89738544	mglw. Zellproliferation	Kutane T-Zell-Lymphome (↑ Expression trunkierter Splice-Variante)	Fellenberg *et al*. 2004
CDC7	91966404	91991321	Replikationsinitiation	u.a. DLBCL, (↑ Expression)	Hou *et al.* 2012
TGFBR3	92145900	92351836	Zellmigrations- und -invasionsregulation	u.a. Mamma-Ca, Prostata-Ca (↓ Expression), Sarkome: t(1;10)(p22;q24)	Gatza *et al.* 2010

Tab. 8.11: Tumor-assoziierte Gene innerhalb FRA1F. Anmerkung: ↑ = Steigerung, ↓ = Verminderung. Daten aus http://atlasgeneticsoncology.org. Fortsetzung auf den folgenden Seiten.

Gen	Start (bp)	Stop (bp)	Funktion	Tumor und Expression	Referenz
PDE4DIP	144951761	144995033	Kodiert putative Domänen der *PDGFRB*-Aktivierung	Chronische eosinophile Leukämie: t(1;5)(q23;q33) (Aktivierung *PDGFRB*)	Wilkinson *et al.* 2003
TXNIP	145438462	145442628	Redoxprozesse , Zellproliferation	u.a. Lymphome, solide Tumore (↓ Expression)	Zhou *et al.* 2011
GNRH2R	145514421	145515899	Splice-abhängige Proliferationsregulation	Mamma-Ca (↑ Expression)	Gründker *et al.* 2010
PIAS3	145575988	145586546	Transkriptionsregulation	u.a. Magen-Ca, Prostata-Ca (↓/↑ Expression)	Liu *et al.* 2011
CD160	145695798	145715565	Zellaktivierung, Zell-Überleben	u.a. Haarzellleukämie, Chronische Lymphatische Leukämie (↑ Expression)	Farren *et al.* 2011
PDZK1	145727666	145764206	Zellmembranaufbau, Signaltransduktion	u.a. Multiples Myelom (↑ Expression)	Inoue *et al.* 2004
NBPF12	146334190	146460430	unklar	Mamma-Ca, Osteosarkome (↑ Expression)	Meza-Zepeda *et al.* 2002
PRKAB2	146626685	146644129	Energiehaushalt	Ovarial-Ca (↑ Expression)	Li *et al.* 2012
CHD1L	146714291	146767447	Transkriptionsregulation	u.a. Ovarial-Ca (↑ Expression)	He *et al.* 2012
BCL9	147013182	147098015	Transkriptionsaktivierung, Zellproliferation	B-ALL: t(1;14)(q21;q32), u.a Kolon-Ca (↑ Expression)	Mani *et al.* 2009
PPIAL4E	148644011	148644795	unklar	Osteosarkom (↑ Expression)	Meza-Zepeda *et al.* 2002
SF3B4	149895209	149900144	RNA-bindend, Splicing-Faktor	ALL, Burkitt-Lymphom: dup (1)(q21.2) (vermutlich ↑ Expression, nicht expilizit beschrieben)	La Starza *et al.* 2007
CEZANNE	149912232	149982686	Zellproliferations-, -migrationsregulation	Mamma-Ca (Amplifikation, ↑ Expression)	Pareja *et al.* 2012
ECM1	150480487	150486265	Zellproliferation, Angiogenese	u.a Mamma-Ca, Magen-Ca (↑ Expression)	Wang *et al.* 2003
MCL1	150547027	150552214	Apoptose-Supressor	u.a. Mamma-Ca, HNSCC (↑ Expression)	Quinn *et al.* 2011
NOHMA	150670535	150693364	Zellzyklusregulation	u.a. Ovarial-Ca, Magen-Ca (↑ Expression)	Shahzad *et al.* 2013
CTSS	150702672	150738433	Zellmigration	u.a. Magen-Ca, Astrozytome (↑ Expression)	Yang *et al.* 2010

Gen	Start (bp)	Stop (bp)	Funktion	Tumor und Expression	Referenz
CTSK	150768684	150780917	Zellmatrix-Umbau	u.a. Plattenepithel-Ca, Mamma-Ca (↑ Expression)	Yan *et al.* 2011
ARNT	150782181	150849244	Transkriptionsregulation	AML, T-ALL, MDS: t(1;12)(q21;p13) Fusionsgen *ETV6-ARNT*	Otsubo *et al.* 2010
SETDB1	150898815	150937220	Transkriptionsregulation	u.a. Mamma-Ca, Melanom (↑ Expression)	Ceol *et al.* 2011
CERS2	150937649	150947479	mglw. Apoptoseregulation	Mamma-Ca (↑ Expression)	Hartmann *et al.* 2012
PRUNE	150980973	151008189	Zellproliferations-/ -motilitätsregulation	u.a. Neuroblastom, Mamma-Ca (↑ Expression)	Carotenuto *et al.* 2013
MLLT11	151032151	151040973	unklar	AML: t(1;11)(q21;q23) (Fusionsgen: MLL-AF1q)	Tse *et al.* 1995
TIPE2	151129105	151132225	Zellproliferationsregulation	Hepatozelluläre Ca (↓ Expression)	Gus-Brautbar *et al.* 2012
PIP5K1A	151171021	151222007	Zellinvasion	Mamma-Ca (↑ Expression)	Yamaguchi *et al.* 2010
PSMD4	151227197	151239954	Regulation von Tumorsuppressorgenen	Multiples Myelom (Amplifikation, ↑ Expression)	Shaughnessy *et al.* 2011
SELENBP1	151336778	151345210	Zellproliferationsregulation	u.a. Mamma-Ca (↓ Expression)	Zhang *et al.* 2013
S100-A10	151955386	151966714	Zellmigrationsregulation	u.a ösophagele Adeno-Ca, Magen-Ca (↑ Expression)	Elsner *et al.* 2012
S100-A11	152004982	152009511	mglw. Zelldifferenzierung	u.a. kleinzellige Lungen-Ca (↓ Expression)	Hao *et al.* 2012
Hornerin	152184558	152196669	mglw. Zellproliferationsregulation	u.a. invasives duktales Mamma-Ca (↓ Expression)	Fleming *et al.* 2012
Cornulin	152381719	152386750	Zellprotektion ggü. chemischen Noxen	u.a HNSCC, Zervix-Ca (↓ Expression)	Merkley *et al.* 2009
SPRR3	152974223	152976332	Zellproliferationsregulation	Kolorektale Ca (↑ Expression)	Cho *et al.* 2010
SPRR2B	153042718	153044084	Zelldifferenzierung	Orale Plattenepithel-Ca (↓ Expression)	Pasini *et al.* 2012
S100A9	153330330	153333503	u.a. Zellmigration	u.a.Mamma-Ca, Kolon-Ca (↑ Expression)	Srikrishna 2012
S100A8	153362508	153363664	u.a. Zellmigration	siehe *S100A9*	Srikrishna 2012
S100A7	153430220	153433137	Entzündungsreaktion,Zelldifferenzierung	u.a. Mamma-Ca, HNSCC (↑ Expression)	Tripathi *et al.* 2010
S100A6	153507076	153508717	Zellproliferationsregulation	u.a. Orale Plattenepithel-Ca (↑ Expression)	Leśniak *et al*. 2009
S100A4	153516098	153518282	Metastasierung	u.a. Orale Plattenepithel-Ca (↑ Expression)	Mishra *et al.* 2012
S100A2	153533585	153538306	unklar	u.a. Orale Plattenepithel-Ca, (↓/↑ Expression)	Wolf *et al.* 2011
S100A14	153586732	153588808	Zellproliferation	u.a. Mamma-Ca, Kolon-Ca (↓/↑ Expression)	Jin *et al.* 2011

Gen	Start (bp)	Stop (bp)	Funktion	Tumor und Expression	Referenz
S100A13	153591276	153606568	Angiogenese	u.a. Melanom (↑ Expression)	Massi *et al.* 2010
S100A1	153600873	153604513	Apoptoseregulation	u.a. Ovarial-Ca (↑ Expression)	DeRycke *et al.* 2009
NPR1	153651164	153666468	Zellproliferationsregulation	Prostata-Ca (↑ Expression)	Wang *et al.* 2011
CRTC2	153920148	153931132	Aromataseregulation	Mamma-Ca (↑ Expression)	Brown und Simpson 2010
CREB3L4	153940315	153946840	Transkriptionsfaktor	Hepatozelluläre Ca (Amplifikation, ↑ Expression)	Inagaki *et al.* 2008
JTB	153946745	153950451	Zellproliferation	Leukämie (Translokation, ↑ Expression)	Kanome *et al.* 2007
RAB13	153954093	153957842	Zellproliferation	Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (↑Expression)	Mahadevan *et al.* 2005
RPS27	153963239	153964631	mglw. Zellproliferation	u.a. HNSCC (↑ Expression)	Xiong *et al.* 2011

Tab. 8.12: Tumor-assoziierte Gene innerhalb FRA1G. Anmerkung: ↑ = Steigerung, ↓ = Verminderung. Daten aus http://atlasgeneticsoncology.org.

Gen	Start (bp)	Stop (bp)	Funktion	Tumor und Expression	Referenz
GORAB	170501263	170514929	Zellproliferationsregualtion	Hepatozelluläre Ca (↓ Expression)	Hu *et al.* 2012
PRRX1	170633313	170708541	Zellmigration	Mamma-Ca (↓ Expression)	Ocaña *et al.* 2012
MIR124	172107938	172108047	Zellproliferationsregulation	u.a. Hepatozelluläre Ca (↓ Expression)	Wang *et al.* 2012
FASL	172628185	172636012	Apoptoseregulation, Zellmigration	u.a. Mamm-Ca (↑ Expression)	Lin *et al.* 2012
GITRL	173010360	173020103	Regulation der Immunantwort	AML (↑ Expression)	Baessler *et al.* 2009
PRDX6	173446486	173457946	Zellinvasion	u.a. Lungen-Ca (↑ Expression)	Lee *et al.* 2009
KLHL20	173684080	173755840	u.a. Zellmigrationsregulation	Prostata-Ca (↑ Expression)	Yuan *et al.* 2011
GAS5	173833039	173837125	Zellproliferationsregulation	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom: t(1;3)(q25;q27) (Fusionsgen: *GAS5-BCL6)*	Nakamura *et al.* 2008
THPH7	173872942	173886516	Koagulationsregulation	Hepatozelluläre Ca (↓ Expression)	Yoon *et al.* 2006
RABGAP1L	174844656	174927327	Zelldifferenzierung	u.a orale Plattenepithel-Ca, ALL. AML: t(Y;1(q12;q25) (drei Kopien, ↑ Expression)	Roberti *et al.* 2009
CACYBP	174968571	174981163	mglw. Zellinvasion	u.a. Mamma-Ca (↑Expression)	Wang *et al.* 2010
TNN	175036994	175117202	mglw. Zellmigration	Mamma-Ca, Kolon-Ca (↑ Expression)	Degen *et al.* 2008
TNR	175291935	175712752	mglw. Zellinvasion	Astrozytom (↑ Expression)	El Ayachi *et al.* 2010
COP1	175913967	176176370	mglw. Zellzyklusregualtion	u.a. Mamma-Ca, ALL, Prostata-Ca (↑/↓Expression)	Marine 2012
ANG3	178818670	178840215	Zellmigrations-, -invasionsregulation	Lungen-Ca (↓ Expression)	Kuo *et al.* 2013
ABL2	179068462	179112224	Zellmigrations-, -proliferationsregualtion	AML: t(1;12)(q25;p13) (Fusionsgen: *ABL2/ETV6*) Mamma-Ca (↑ Expression)	Gil-Henn *et al.* 2013
NDSP	179712298	179785333	Zellproliferation	Neuroblastom (↑ Expression)	Vasudevan *et al.* 2009
QSOX1	180123968	180167169	Zellproliferation, Zellinvasion	u.a. Mamma-Ca (↑ Expression)	Katchman *et al.* 2013
LHX4	180199433	180244188	mglw. Zellproliferation	ALL, Chronische Myeloische Leukämie: t(1;14)(q25;q32) (↑ Expression)	Yamaguchi *et al.* 2003

Tab. 8.13: Tumor-assoziierte Gene innerhalb FRA1K. Anmerkung: ↑ = Steigerung, ↓ = Verminderung. Daten aus http://atlasgeneticsoncology.org.

Gen	Start (bp)	Stop (bp)	Funktion	Tumor und Expression	Referenz
RGS1	192544857	192549159	Migration regulatorischer T-Zellen	u.a. Nierenzell-Ca, Prostata-Ca (↑ Expression)	Huen *et al.* 2013
RGS13	192605268	192629440	Migration der Lymphozyten	Akute T-Zell-Leukämie (↑ Expression)	Pise-Masison *et al.* 2009
RGS2	192778169	192781407	Zellproliferationsregulation	Mamma-Ca (↑ Expression)	Smalley *et al.* 2007
UCH37	192981496	193028523	Zellinvasion, Zellmigration	Hepatozelluläre Ca (↑ Expression)	Fang *et al.* 2013
GLRX2	193065595	193075187	Redoxsystem	Melanome (↑ Expression)	Su *et al.* 2009
CDC73	193091088	193223942	Apoptoseregulation	u.a Orale Plattenepithel-Ca (↓ Expression)	Rather *et al.* 2013
CFH	196621008	196716634	Immunantwort	u.a. Lungen-Ca (↑ Expression)	Cui *et al.* 2011
ASPM	197053257	197115824	Zellzyklusregulation	Ovarial-Ca, Gliome, Melanome (↑ Expression)	Brüning-Richardson *et al*. 2011
PTPRC	198608098	198664300	Transkriptionsaktivierung	Akute T-Zell-Leukämie (Mutationen, ↑ Expression)	Porcu *et al.* 2012
MIR181-B1	198828002	198828111	Zellproliferationsregulation	Chronische Lymphatische Leukämie (↓ Expression)	Visone *et al.* 2011
MIR181A1	198828173	198828282	mglw. Zellzyklusregualtion	AML (Deletion, ↓ Expression)	Nowak *et al.* 2012
LRH-1	200011953	200146550	Zellproliferationsregulation	Pankreas-Ca, Kolon-Ca, Mamma-Ca (↑ Expression)	Lazarus *et al.* 2012
KIF14	200520625	200589862	Zellproliferation, Zellmigration	u.a. Retinoblastom, Hepatozelluläre Ca (1q-Amplifikation,↑ Expression)	Yang *et al.* 2013b
PKP1	201252580	201302121	Zell-Zell-Kontakt	u.a. HNSCC (↓ Expression)	Teh *et al.* 2011
PHLDA3	201434622	201438299	Zellproliferations-, Apoptoseregulation	Mamma-Ca (↓ Expression)	Christgen *et al.* 2012
CRIP1	201452658	201476387	Transkriptionsregulation	Prostata-Ca (Hypomethylierung,↑ Expression)	Wang *et al.* 2007
TIMM17A	201924619	201939789	Zellproliferation	Mamma-Ca (↑ Expression)	Xu *et al.* 2010
ELF3	201979690	201986315	Zellproliferation, Zelldifferenzierung	Mamma-Ca (1q32-Amplifikation, ↑ Expression)	Mesquita *et al.* 2013
PTPN7	202116141	202130716	Zellproliferation	u.a. AML (Amplifikation, ↑ Expression)	Zanke *et al.* 1994
UBE2T	202300785	202311094	Zellproliferation	Mamma-Ca (↑ Expression)	Ueki *et al.* 2009
JARID1B	202696532	202777549	Zellproliferation	u.a. Mamma-Ca, Prostata-Ca (↑ Expression)	Blair *et al.* 2011

Tab. 8.14: Beurteilung der Fragilität bzw. Stabilität der einzelnen Chromosomenbanden in MMC-behandelten FA-Material mittels BINOMVERT-Funktion (Microsoft Excel®). Anmerkung: k = Anzahl der beobachteten Bruchereignisse innerhalb der jeweiligen Bande; f? = Beurteilung der Fragilität mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur unter Annahme des mittleren Bandenstadiums von 412; s? = Beurteilung der Stabilität unter Vernachlässigung der Bonferroni-Korrektur, da selbst für große, nicht von Bruchereignissen betroffenen Chromosomenbanden nach Bonferroni keine Signifikanz bestand (Zeichen eines für diese Hypothese zu geringen Stichprobenumfangs); n.e. = nicht ermittelbar (bspw. aufgrund Bruchereignis in übergeordneter Bande). Banden, welche weder mit „f“ (besonders fragil) noch „s“ (besonders stabil) gekennzeichnet sind, können als durchschnittlich stabil bzw. fragil bewertet werden. Fortsetzung auf folgenden Seiten.

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
1p36.3	7200000	14	0,0000	f	1,0000		9	0,0000	f	1,0000		15	0,0000	f	1,0000		6	0,0338		0,9893	
1p36.2	9000000	3	0,4544		0,7604			1,0000		0,1303		2	0,9358		0,1819		1	0,9495		0,2019	
1p36.1	11800000	6	0,1112		0,9528		6	0,0523		0,9816		11	0,0317		0,9860		12	0,0007		0,9998	
1p35	6600000		1,0000		0,1597			1,0000		0,2248			1,0000		0,0386	s		1,0000		0,1122	
1p34	12200000	7	0,0546		0,9788		3	0,5195		0,7037		8	0,2491		0,8539		5	0,3768		0,7816	
1p33	3900000		1,0000		0,3389			1,0000		0,4145			1,0000		0,1472			1,0000		0,2751	
1p32	10600000	13	0,0000	f	1,0000		6	0,0340		0,9892		10	0,0369		0,9840		8	0,0260		0,9905	
1p31	23600000	6	0,6389		0,5205		2	0,9705		0,0973		9	0,8204		0,2775		4	0,9533		0,1090	
1p22	9800000	4	0,2880		0,8625		3	0,3798		0,8186		7	0,2060		0,8900		9	0,0058		0,9982	
1p21	12500000		1,0000		0,0305	s	1	0,9414		0,2261		2	0,9853		0,0545		1	0,9843		0,0812	
1p13	10600000	4	0,3376		0,8277		8	0,0030		0,9992		7	0,2634		0,8495		8	0,0260		0,9905	
1p12	2800000		1,0000		0,4601			1,0000		0,5316			1,0000		0,2531			1,0000		0,3961	
1p11	4400000	6	0,0015		0,9997			1,0000		0,3701		4	0,1703		0,9337		5	0,0162		0,9963	
1q11	3900000	2	0,2934		0,9051		3	0,0590		0,9878		8	0,0007		0,9999		4	0,0415		0,9899	
1q12	13700000	9	0,0148		0,9948		1	0,9554		0,1843		5	0,8025		0,3368		6	0,3006		0,8293	
1q21	12400000	12	0,0002		0,9999		13	0,0000	f	1,0000		22	0,0000	f	1,0000		19	0,0000	f	1,0000	
1q22	1500000		1,0000		0,6600		1	0,2870		0,9544			1,0000		0,4796		1	0,3909		0,9113	
1q23	9000000	1	0,9184		0,2874		1	0,8697		0,3971		4	0,6434		0,5502		2	0,7981		0,4284	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
1q24	7400000	1	0,8723		0,3919			1,0000		0,1874			1,0000		0,0260	s	1	0,9140		0,2978	
1q25	12900000	10	0,0034		0,9990		2	0,7887		0,4429		13	0,0115		0,9952		5	0,4222		0,7441	
1q31	12900000	7	0,0690		0,9718			1,0000		0,0535		3	0,9529		0,1218		3	0,7996		0,3828	
1q32	15800000	2	0,9342		0,1854		4	0,4773		0,7148		13	0,0480		0,9758		7	0,2693		0,8447	
1q41	9600000	1	0,9310		0,2547			1,0000		0,1136		4	0,6926		0,4942		2	0,8264		0,3849	
1q42	12500000	2	0,8620		0,3262		4	0,3114		0,8464		9	0,1614		0,9114		4	0,5926		0,6037	
1q43	7100000	1	0,8611		0,4144			1,0000		0,2007		1	0,9699		0,1366			1,0000		0,0950	
1q44	5550621		1,0000		0,2140		1	0,7148		0,6441		5	0,1379		0,9434		2	0,5476		0,7219	
2p25	12200000	3	0,6578		0,5630		4	0,2963		0,8569		6	0,5511		0,6119		5	0,3768		0,7816	
2p24~25												1									
2p24	11800000		1,0000		0,0372	s		1,0000		0,0688		6	0,5186		0,6438		1	0,9802		0,0980	
2p23~24							1					1									
2p22~23																	1				
2p23	8100000	4	0,1879		0,9241		6	0,0107		0,9974		4	0,5607		0,6366		3	0,5009		0,7199	
2p22	9700000		1,0000		0,0671		1	0,8889		0,3565		2	0,9518		0,1448			1,0000		0,0400	s
2p21	6000000	1	0,8112		0,5049		5	0,0121		0,9974		3	0,5634		0,6622		4	0,1390		0,9496	
2p16	13500000		1,0000		0,0230	s		1,0000		0,0466	s		1,0000		0,0012	s	1	0,9888		0,0619	
2p15	2800000	5	0,0012		0,9999		1	0,4684		0,8680		2	0,3979		0,8414		4	0,0145		0,9974	
2p14	4500000		1,0000		0,2868			1,0000		0,3619			1,0000		0,1094			1,0000		0,2254	
2p13	6400000	8	0,0005		0,9999		9	0,0000	f	1,0000		12	0,0001	f	1,0000		7	0,0059		0,9985	
2p12~13							1														

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
2p12	8300000		1,0000		0,0993			1,0000		0,1528			1,0000		0,0166	s		1,0000		0,0637	
2p11.2	7200000		1,0000		0,1350		1	0,8039		0,5170		2	0,8686		0,3146		3	0,4248		0,7839	
2p11.1	2800000	2	0,1820		0,9565			1,0000		0,5316		10	0,0000	f	1,0000		3	0,0667		0,9855	
2q11.1	3500000	7	0,0001	f	1,0000		1	0,5462		0,8130		3	0,2455		0,9059		4	0,0298		0,9935	
2q11.2	5900000	4	0,0826		0,9750		4	0,0455		0,9887		6	0,0713		0,9730		5	0,0476		0,9855	
2q12	7500000	1	0,8758		0,3846			1,0000		0,1832			1,0000		0,0247	s		1,0000		0,0832	
2q12~13												1									
2q13	4200000	4	0,0301		0,9934		8	0,0000	f	1,0000		4	0,1518		0,9433		5	0,0135		0,9970	
2q14	15500000		1,0000		0,0131	s		1,0000		0,0295	s	2	0,9961		0,0175	s		1,0000		0,0057	s
2q14.3~21																	1				
2q21	6900000	5	0,0440		0,9870		8	0,0002		1,0000		15	0,0000	f	1,0000		7	0,0087		0,9977	
2q22	11900000		1,0000		0,0362	s	1	0,9328		0,2500			1,0000		0,0027	s		1,0000		0,0192	s
2q23	6200000	2	0,5125		0,7535		1	0,7539		0,5924		3	0,5856		0,6401		2	0,6076		0,6638	
2q24	14800000		1,0000		0,0160	s		1,0000		0,0346	s	4	0,9333		0,1476			1,0000		0,0073	s
2q31	13300000	4	0,5030		0,6917		7	0,0322		0,9888		14	0,0062		0,9975		10	0,0140		0,9947	
2q32	14400000	1	0,9821		0,0905			1,0000		0,0380	s	3	0,9732		0,0760		6	0,3409		0,7983	
2q33	11600000	5	0,2199		0,8952		6	0,0489		0,9831		9	0,1177		0,9395		6	0,1879		0,9075	
2q34	6300000		1,0000		0,1736			1,0000		0,2406			1,0000		0,0448	s		1,0000		0,1240	
2q35	6200000	5	0,0300		0,9920		1	0,7539		0,5924		4	0,3599		0,8112		5	0,0564		0,9820	
2q36	9500000		1,0000		0,0709			1,0000		0,1162			1,0000		0,0091	s	1	0,9573		0,1781	
2q37	12199373	7	0,0545		0,9788		6	0,0594		0,9785		15	0,0011		0,9996		7	0,1123		0,9483	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
3p26	8700000		1,0000		0,0888		4	0,1349		0,9517		2	0,9275		0,2001		4	0,3242		0,8370	
3p25	7700000	5	0,0642		0,9789		5	0,0312		0,9915		6	0,1776		0,9143		3	0,4677		0,7488	
3p24	14500000	1	0,9826		0,0885			1,0000		0,0371	s	4	0,9264		0,1601		1	0,9920		0,0470	s
3p23	1200000		1,0000		0,7173			1,0000		0,7630		4	0,0030		0,9997		1	0,3274		0,9395	
3p22~23												1									
3p22	11600000		1,0000		0,0393	s		1,0000		0,0720		1	0,9968		0,0217	s		1,0000		0,0212	s
3p21~22												1									
3p21	10700000	12	0,0001	f	1,0000		15	0,0000	f	1,0000		16	0,0001	f	1,0000		18	0,0000	f	1,0000	
3p14	15400000	2	0,9279		0,1992		5	0,2680		0,8633		3	0,9818		0,0547		6	0,3992		0,7507	
3p13	4400000	4	0,0348		0,9920		1	0,6299		0,7389		1	0,8850		0,3650			1,0000		0,2331	
3p12	13000000		1,0000		0,0265	s	1	0,9477		0,2078		3	0,9546		0,1181		1	0,9867		0,0710	
3p11	3800000	4	0,0220		0,9956		3	0,0555		0,9888		5	0,0400		0,9884		2	0,3573		0,8677	
3q11.1	2900000	3	0,0474		0,9910		1	0,4803		0,8604		2	0,4149		0,8296			1,0000		0,3832	
3q11.2	4400000	1	0,7051		0,6561		1	0,6299		0,7389			1,0000		0,1150			1,0000		0,2331	
3q11.2~12							1														
3q12	4500000	1	0,7132		0,6461		1	0,6381		0,7306		5	0,0715		0,9758			1,0000		0,2254	
3q13	19100000		0,9697		0,0995			0,9304		0,1938		3	0,9589		0,0913			0,9983		0,0127	s
3q13.1	8500000		1,0000		0,0939		1	0,8540		0,4282			1,0000		n.e.			1,0000		0,0596	
3q13.2	2200000		1,0000		0,5435			1,0000		0,6088			1,0000		n.e.			1,0000		0,4832	
3q13.3	8400000	2	0,6764		0,5891		1	0,8507		0,4346		2	0,9181		n.e.		1	0,9384		0,2342	
3q21	7300000	9	0,0002		1,0000		12	0,0000	f	1,0000		11	0,0010		0,9997		8	0,0033		0,9992	
3q21~22												1									

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
3q22	9500000		1,0000		0,0709			1,0000		0,1162			1,0000		0,0091	s		1,0000		0,0427	s
3q23	4100000	2	0,3137		0,8939			1,0000		0,3962		2	0,5967		0,6754		1	0,7426		0,6076	
3q23~24												1									
3q24	6100000	1	0,8164		0,4961			1,0000		0,2518			1,0000		0,0495	s		1,0000		0,1325	
3q25	11800000	2	0,8394		0,3644		1	0,9312		0,2542		11	0,0317		0,9860		7	0,0989		0,9559	
3q25~26							1														
3q26	22000000		1,0000		0,0021	s		1,0000		0,0066	s	2	0,9998		0,0012	s	1	0,9994		0,0054	s
3q27	5200000	4	0,0575		0,9846			1,0000		0,3088		7	0,0148		0,9956		4	0,0952		0,9697	
3q28	4400000		1,0000		0,2949			1,0000		0,3701		1	0,8850		0,3650		1	0,7669		0,5733	
3q29	5722430	2	0,4704		0,7881		3	0,1399		0,9585		5	0,1507		0,9364		2	0,5641		0,7066	
4p16	11300000	1	0,9572		0,1787		10	0,0003		0,9999		11	0,0242		0,9897		5	0,3186		0,8267	
4p15~16							1														
4p15.3	10000000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		3	0,8690		n.e.		1	0,9639		n.e.	
4p15.2	6400000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
4p15.1	8100000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
4p15	24500000	6	0,6743		0,4811		2	0,9753		0,0842		4	0,9583		0,0837		4	0,9084		0,1794	
4p14	5400000	3	0,1892		0,9358		3	0,1236		0,9652		2	0,7424		0,5073			1,0000		0,1672	
4p13	3400000		1,0000		0,3895			1,0000		0,4642		1	0,8117		0,5041		1	0,6753		0,6906	
4p12	3600000		1,0000		0,3684			1,0000		0,4436		5	0,0329		0,9910		3	0,1178		0,9675	
4p11	2200000	3	0,0238		0,9965			1,0000		0,6088		8	0,0000	f	1,0000			1,0000		0,4832	
4q11	2300000	2	0,1338		0,9734			1,0000		0,5952		1	0,6763		0,6899		2	0,1766		0,9584	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
4q11~12							1														
4q12	6800000	3	0,2911		0,8788		5	0,0197		0,9953		7	0,0511		0,9804		4	0,1891		0,9232	
4q13	16800000	1	0,9909		0,0522			1,0000		0,0219	s		1,0000		0,0002	s	3	0,9165		0,1938	
4q21	11700000	6	0,1080		0,9545		7	0,0176		0,9946		11	0,0301		0,9868		5	0,3444		0,8071	
4q22	10800000	1	0,9507		0,1987		1	0,9136		0,2994			1,0000		0,0047	s	1	0,9723		0,1275	
4q23	2300000		1,0000		0,5287		2	0,0956		0,9843			1,0000		0,3237			1,0000		0,4674	
4q24	6600000		1,0000		0,1597			1,0000		0,2248			1,0000		0,0386	s		1,0000		0,1122	
4q25	6400000	1	0,8311		0,4706		1	0,7648		0,5769		5	0,2057		0,9041		6	0,0206		0,9941	
4q26	6700000		1,0000		0,1553			1,0000		0,2197		1	0,9632		0,1592			1,0000		0,1085	
4q27	3000000	4	0,0101		0,9984		5	0,0006		0,9999		12	0,0000	f	1,0000		5	0,0034		0,9995	
4q28	15700000		1,0000		0,0124	s		1,0000		0,0282	s	1	0,9996		0,0036	s		1,0000		0,0054	s
4q31	16100000	6	0,2883		0,8390		8	0,0306		0,9886		21	0,0000	f	1,0000		10	0,0194		0,9920	
4q31.1	2000000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,6248		n.e.			1,0000		n.e.	
4q31.2	9600000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
4q31.3	4500000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,8906		n.e.		1	0,7746		n.e.	
4q32	14500000	2	0,9115		0,2334			1,0000		0,0371	s		1,0000		0,0007	s		1,0000		0,0080	s
4q33	1800000	2	0,0894		0,9859		2	0,0629		0,9919		4	0,0123		0,9979			1,0000		0,5516	
4q34	11300000		1,0000		0,0428	s		1,0000		0,0771			1,0000		0,0037	s		1,0000		0,0234	s
4q34~35		1																			
4q35	7954276	6	0,0242		0,9929		4	0,1066		0,9649		7	0,0974		0,9568		3	0,2695		0,8745	
4q35.1	3900000		1,0000		n.e.			1,0000		0,4145			1,0000		n.e.		1	0,7249		n.e.	
4q35.2	4054276		1,0000		n.e.			1,0000		0,4003			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
5p15.3	9800000		1,0000		n.e.		1	0,8914		n.e.		4	0,7079		n.e.		2	0,8350		n.e.	
5p15.2	5200000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,9226		n.e.			1,0000		n.e.	
5p15.1	3400000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		2	0,4959		n.e.			1,0000		n.e.	
5p15	18400000	3	0,8860		0,2488		1	0,9207		0,2145		6	0,1190		0,9309		3	0,7277		0,4318	
5p14	10500000	3	0,5568		0,6686		1	0,9074		0,3142		2	0,9655		0,1106		3	0,6747		0,5431	
5p13~14												1									
5p13	13600000	3	0,7278		0,4796		2	0,8125		0,4071		7	0,4987		0,6516		5	0,4669		0,7051	
5p12~13												1									
5p12	3600000	2	0,2628		0,9209			1,0000		0,4436		1	0,8293		0,4737			1,0000		0,3039	
5p11	2300000	2	0,1338		0,9734			1,0000		0,5952		11	0,0000	f	1,0000		7	0,0000	f	1,0000	
5q11.1	2300000	3	0,0266		0,9960			1,0000		0,5952		1	0,6763		0,6899			1,0000		0,4674	
5q11.2	8200000	1	0,8979		0,3364			1,0000		0,1563		2	0,9113		0,2337		6	0,0566		0,9797	
5q12	7800000		1,0000		0,1142			1,0000		0,1711		2	0,8961		0,2638		1	0,9247		0,2708	
5q13	10200000	6	0,0657		0,9756		7	0,0089		0,9976		7	0,2341		0,8706		4	0,4352		0,7507	
5q14	15400000		1,0000		0,0135	s		1,0000		0,0302	s	1	0,9995		0,0041	s		1,0000		0,0059	s
5q15	5900000	2	0,4863		0,7753		2	0,3839		0,8508		8	0,0091		0,9973		2	0,5807		0,6907	
5q21	11400000	2	0,8250		0,3876			1,0000		0,0754		1	0,9965		0,0236	s	1	0,9774		0,1089	
5q22	5600000	3	0,2032		0,9287			1,0000		0,2820		3	0,5169		0,7060		9	0,0001		1,0000	
5q23	15400000		1,0000		0,0135	s		0,9698		0,1368			1,0000		0,0005	s		1,0000		0,0059	s
5q23.1	6200000		1,0000		0,1786		1	0,7539		0,5924			1,0000		0,0471	s		1,0000		0,1282	
5q23.2	5900000		1,0000		0,1941			1,0000		0,2635			1,0000		0,0547			1,0000		0,1416	
5q23.3	3300000		1,0000		0,4005			1,0000		0,4748			1,0000		0,1979			1,0000		0,3356	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
5q31	13900000	4	0,3408		0,8104		8	0,0142		0,9954		12	0,0418		0,9800		15	0,0001	f	1,0000	
5q31.1	5600000	1	0,7889		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
5q31.2	3300000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
5q31.3	5000000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
5q32	5300000	2	0,4315		0,8177			1,0000		0,3019		3	0,4804		0,7384			1,0000		0,1729	
5q33	10100000	3	0,5306		0,6935		1	0,8986		0,3348		4	0,7297		0,4492		1	0,9650		0,1528	
5q34	8600000	1	0,9087		0,3111			1,0000		0,1427		2	0,9245		0,2065			1,0000		0,0577	
5q34~35							1														
5q35	12415260	6	0,0588		0,9768		2	0,7706		0,4687		2	0,9437		0,1409		3	0,7781		0,4128	
5q35.1	4300000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
5q35.2	3800000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
5q35.3	4315260	1	0,6981		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,8801		n.e.			1,0000		n.e.	
6p25	7100000	1	0,8611		0,4144		2	0,4758		0,7838		4	0,4582		0,7316		3	0,4161		0,7907	
6p24	6300000		1,0000		0,1736			1,0000		0,2406			1,0000		0,0448	s		1,0000		0,1240	
6p23	1800000	1	0,3927		0,9106		5	0,0001	f	1,0000		5	0,0021		0,9997		6	0,0000	f	1,0000	
6p22	15200000	5	0,4117		0,7536		1	0,9684		0,1417		2	0,9955		0,0197	s	1	0,9937		0,0387	s
6p21	15800000	6	0,1506		0,9258		8	0,0034		0,9990		9	0,2470		0,8463		7	0,1553		0,9185	
6p21.3	6200000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
6p21.2	3900000		1,0000		n.e.		1	0,5855		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
6p21.1	5700000	1	0,7947		n.e.		1	0,7243		n.e.		1	0,9396		n.e.		1	0,8486		n.e.	
6p12	10800000	1	0,9507		0,1987			1,0000		0,0864		1	0,9953		0,0304	s		1,0000		0,0277	s

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
6p11.2	1700000		1,0000		0,6244		2	0,0569		0,9930			1,0000		n.e.		1	0,4299		n.e.	
6p11.1	2300000		1,0000		0,5287			1,0000		0,5952			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
6p11	4000000		1,0000		0,3296			0,2279		0,9373		4	0,1341		0,9521		4	0,0112		0,9977	
6q11	2400000	4	0,0047		0,9994		2	0,1026		0,9825			1,0000		0,3082		1	0,5478		0,8116	
6q12	6600000	1	0,8403		0,4540		1	0,7752		0,5615		1	0,9614		0,1654		1	0,8878		0,3585	
6q13	5900000	2	0,4863		0,7753		2	0,3839		0,8508		11	0,0002		1,0000		6	0,0145		0,9962	
6q14~15																	1				
6q14	12100000		1,0000		0,0342	s	1	0,9358		0,2418			1,0000		0,0025	s	1	0,9821		0,0905	
6q15	5100000		1,0000		0,2427		2	0,3191		0,8908		2	0,7134		0,5446		2	0,5024		0,7616	
6q15~16																	1				
6q16	12400000				0,0314	s				0,0600					0,0021	s				0,0162	s
6q21	9100000	4	0,2456		0,8901		6	0,0179		0,9951		8	0,0802		0,9638		5	0,1848		0,9166	
6q22	15700000		1,0000		0,0124	s		1,0000		0,0282	s	5	0,7827		0,3501		3	0,8921		0,2376	
6q22.1	3700000		1,0000		0,3583			1,0000		0,4337			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
6q22.2	200000		1,0000		0,9462			1,0000		0,9559		1	0,0932		n.e.			1,0000		n.e.	
6q22.3	11800000		1,0000		0,0372	s		1,0000		0,0688			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
6q23	8700000		1,0000		0,0888			1,0000		0,1395		7	0,1366		0,9344		7	0,0269		0,9910	
6q23~24																	1				
6q24	10000000		1,0000		0,0617			1,0000		0,1037			1,0000		0,0071	s	1	0,9639		0,1568	
6q24~25							1														
6q25	12000000	2	0,8462		0,3532		1	0,9343		0,2459		3	0,9346		0,1594		1	0,9815		0,0929	
6q26	3500000	6	0,0005		0,9999		1	0,5462		0,8130		7	0,0018		0,9996		4	0,0298		0,9935	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
6q26~27							1					1									
6q27	6615067		1,0000		0,1590		2	0,4396		0,8117		4	0,4056		0,7755		4	0,1770		0,9299	
7p22	7300000	2	0,6007		0,6713		2	0,4903		0,7721		6	0,1500		0,9310		5	0,0964		0,9643	
7p21.3	6500000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,8840		0,3668	
7p21.2	2700000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		0,4095	
7p21.1	4400000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		0,2331	
7p21	13600000	2	0,8917		0,2722		1	0,9544		0,1875		4	0,9019		0,2027			0,9892		0,0603	
7p15.3	4600000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,7819		n.e.	
7p15.2	2500000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
7p15.1	800000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
7p15	7900000	3	0,3738		0,8230		2	0,5322		0,7362		3	0,7440		0,4590		6	0,0170		0,9948	
7p14	14500000		1,0000		0,0174	s		1,0000		0,0371	s	5	0,8399		0,2846			1,0000		0,0080	s
7p13	2100000	2	0,1155		0,9789		2	0,0820		0,9877		6	0,0006		0,9999		5	0,0007		0,9999	
7p12	8600000		1,0000		0,0913			1,0000		0,1427		1	0,9857		0,0755			1,0000		0,0577	
7p11.2	4000000		1,0000		0,3296			1,0000		n.e.		3	0,3113		n.e.			1,0000		n.e.	
7p11.1	1900000		1,0000		0,5907			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
7p11	5900000		1,0000		0,1941		2	0,3839		0,8508		5	0,0091		0,9973		4	0,1331		0,9524	
7q11.1	1800000	1	0,3927		0,9106			1,0000		0,6663		2	0,2202		0,9408		2	0,1199		0,9776	
7q11.2	15800000		0,6383		0,5558			0,0003		0,9999		1	0,0003		0,9999		2	0,0070		0,9974	
7q11.21	5300000		1,0000		0,2295			1,0000		0,3019		1	0,9264		n.e.			1,0000		n.e.	
7q11.22	5200000		1,0000		0,2360			1,0000		0,3088			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
7q11.23	5300000	4	0,0608		0,9834		12	0,0000	f	1,0000		17	0,0000	f	n.e.		10	0,0000	f	n.e.	
7q21	20500000	1	0,9968		0,0217	s		1,0000		0,0093	s	4	0,9740		0,0615		1	0,9989		0,0084	s
7q21.1	13600000		1,0000		n.e.			1,0000		0,0456	s		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
7q21.2	1700000		1,0000		n.e.			1,0000		0,6815			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
7q21.3	5200000		1,0000		n.e.			1,0000		0,3088		1	0,9226		n.e.			1,0000		n.e.	
7q22	9400000	5	0,1214		0,9521		3	0,3554		0,8361		9	0,0429		0,9818		7	0,0382		0,9862	
7q31	19700000	4	0,7966		0,3621			1,0000		0,0112	s	6	0,9228		0,1486			1,0000		0,0014	s
7q31.3~32		2																			
7q32	5500000	3	0,1962		0,9323		4	0,0368		0,9914		6	0,0546		0,9806		10	0,0000	f	1,0000	
7q33	5600000		1,0000		0,2111		1	0,7180		0,6401			1,0000		0,0635			1,0000		0,1565	
7q34	4900000	2	0,3932		0,8446		1	0,6695		0,6974		2	0,6925		0,5701		5	0,0243		0,9938	
7q34~35																	1				
7q35	4800000	1	0,7362		0,6165			1,0000		0,3381			1,0000		0,0943			1,0000		0,2041	
7q36	11238663	5	0,2022		0,9062		3	0,4653		0,7513		9	0,1023		0,9490		5	0,3146		0,8296	
8p23.3	2200000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,6599		n.e.			1,0000		n.e.	
8p23.2	4000000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
8p23.1	6500000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,9594		n.e.		1	0,8840		n.e.	
8p23	12700000	5	0,2764		0,8575		3	0,5465		0,6785		5	0,4279		0,7164		3	0,6050		0,5907	
8p22	6300000	2	0,5210		0,7461		1	0,7594		0,5846		1	0,9552		0,1852			1,0000		0,1240	
8p21	9800000	5	0,1375		0,9436		1	0,8914		0,3510		5	0,5240		0,6529		11	0,0005		0,9999	
8p12	7700000		1,0000		0,1174			1,0000		0,1751		2	0,8919		0,2718		1	0,9222		0,2773	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
8p11.2	6600000	3	0,2762		0,8879		2	0,4385		0,8126		6	0,1069		0,9551		1	0,8878		0,3585	
8p11.1	2500000	2	0,1527		0,9671			1,0000		0,5689		6	0,0016		0,9997			1,0000		0,4375	
8q11.1	2500000	1	0,4999		0,8473		1	0,4311		0,8902		2	0,3457		0,8751		6	0,0002		1,0000	
8q11.2	7400000	1	0,8723		0,3919		3	0,2338		0,9125		2	0,8784		0,2969			1,0000		0,0860	
8q12	10500000		1,0000		0,0536		1	0,9074		0,3142		1	0,9945		0,0345	s		1,0000		0,0306	s
8q13	7900000	3	0,3738		0,8230		2	0,5322		0,7362		11	0,0019		0,9994		5	0,1230		0,9511	
8q21	19400000		1,0000		0,0043	s		1,0000		0,0120	s	1	0,9964		0,0134	s	1	0,9985		0,0116	s
8q21.1	10700000		1,0000		0,0507			1,0000		0,0884		1	0,9950		n.e.			1,0000		n.e.	
8q21.2	2300000		1,0000		0,5287			1,0000		0,5952			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
8q21.3	6400000		1,0000		0,1689			1,0000		0,2352		1	0,9573		n.e.			1,0000		n.e.	
8q22	12900000	7	0,0690		0,9718		3	0,5571		0,6683		5	0,7585		0,3944		2	0,9271		0,2004	
8q23	11500000	2	0,8287		0,3817			1,0000		0,0737		2	0,9774		0,0781			1,0000		0,0219	s
8q24	28664022	3	0,5400		0,6024		2	0,4681		0,6801		4	0,8349		0,2495		2	0,8366		0,2682	
8q24.1	9600000	2	0,7453		n.e.			1,0000		n.e.		4	0,6926		n.e.		3	0,6151		n.e.	
8q24.2	12600000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
8q24.3	6464022	3	0,2660		n.e.		5	0,0162		n.e.		3	0,6138		n.e.		2	0,6302		n.e.	
9p24	9000000		1,0000		0,0816		2	0,6029		0,6691		1	0,9883		0,0642		3	0,5716		0,6535	
9p23~24												1									
9p23	5200000	1	0,7640		0,5780			1,0000		0,3088		2	0,7233		0,5320		1	0,8213		0,4873	
9p22~23							1														
9p22	5700000	3	0,2103		0,9251		1	0,7243		0,6321		2	0,7689		0,4712		4	0,1217		0,9579	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
9p21	13300000	2	0,8842		0,2862			1,0000		0,0488	s	4	0,8923		0,2187		2	0,9346		0,1840	
9p13	7800000	5	0,0670		0,9777		3	0,2577		0,8989		3	0,7362		0,4690		7	0,0160		0,9952	
9p12~13																	1				
9p11~12																	1				
9p12	2600000		1,0000		0,4864			1,0000		0,5562		2	0,3633		0,8642			1,0000		0,4232	
9p11	5400000	2	0,4408		0,8108		1	0,7049		0,6564		2	0,7424		0,5073		2	0,5329		0,7353	
9q11	1700000	3	0,0121		0,9986			1,0000		0,6815		4	0,0101		0,9984		5	0,0003		1,0000	
9q12	15200000	6	0,2464		0,8690			1,0000		0,0316	s	8	0,4667		0,6727		5	0,5644		0,6125	
9q12~13		1										1									
9q13	2800000	15	0,0000	f	1,0000		5	0,0005		1,0000		10	0,0000	f	1,0000		7	0,0000	f	1,0000	
9q21	21700000		1,0000		0,0023	s	3	0,8689		0,2775		5	0,9826		0,0431	s		1,0000		0,0007	s
9q22	12200000	2	0,8527		0,3422		10	0,0005		0,9999		11	0,0388		0,9823		9	0,0214		0,9919	
9q31	12300000	2	0,8558		0,3368			1,0000		0,0614		1	0,9978		0,0160	s	3	0,7728		0,4201	
9q32	2800000	3	0,0435		0,9920		1	0,4684		0,8680		6	0,0027		0,9995		4	0,0145		0,9974	
9q33	12600000		1,0000		0,0297	s		1,0000		0,0573		1	0,9981		0,0141	s	1	0,9848		0,0791	
9q34	10913431	7	0,0010		0,9997		7	0,0125		0,9964		7	0,0434		0,9806		3	0,0113		0,9962	
9q34.1	5600000	1	0,7889		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,9365		n.e.		1	0,8435		n.e.	
9q34.2	1500000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
9q34.3	3813431	2	0,2846		n.e.			1,0000		n.e.		2	0,5573		n.e.		5	0,0092		n.e.	
10p15	6600000	1	0,8403		0,4540		1	0,7752		0,5615		3	0,6278		0,5960		2	0,6415		0,6280	
10p14	5600000		1,0000		0,2111			1,0000		0,2820		2	0,7603		0,4831		1	0,8435		0,4476	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
10p13~14												1									
10p13	5100000	2	0,4125		0,8313		5	0,0063		0,9989		4	0,2404		0,8933		1	0,8153		0,4976	
10p12	12300000	2	0,8558		0,3368		1	0,9386		0,2339		5	0,7210		0,4409			1,0000		0,0168	s
10p11.2	8400000	3	0,4109		0,7952			1,0000		0,1493		9	0,0234		0,9911		1	0,9384		0,2342	
10p11.1	2200000	2	0,1246		0,9762			1,0000		0,6088		4	0,0236		0,9952		2	0,1650		0,9627	
10q11.1	2100000	1	0,4412		0,8845		1	0,3773		0,9180		2	0,2741		0,9152		1	0,5006		0,8466	
10q11.2	10600000	7	0,0292		0,9901		3	0,4279		0,7819		3	0,8931		0,2365		3	0,6808		0,5359	
10q21	17700000	1	0,9930		0,0423	s		1,0000		0,0178	s	1	0,9999		0,0014	s	2	0,9810		0,0674	
10q22	11400000	5	0,2101		0,9014		5	0,1169		0,9544		12	0,0109		0,9957		5	0,3250		0,8219	
10q23	15000000	2	0,9210		0,2138			1,0000		0,0331	s	9	0,2015		0,8801		4	0,7307		0,4473	
10q23.1	5900000		1,0000		n.e.			1,0000		0,2635			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
10q23.2	1600000		1,0000		n.e.			1,0000		0,6971			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
10q23.3	7500000		1,0000		n.e.			1,0000		0,1832		1	0,9753		n.e.			1,0000		n.e.	
10q24	8800000	8	0,0034		0,9991		5	0,0502		0,9846		7	0,1424		0,9309		6	0,0738		0,9717	
10q25	13300000		1,0000		0,0244	s	2	0,8026		0,4222		5	0,7813		0,3649		2	0,9346		0,1840	
10q25~26																	1				
10q26	16434747	3	0,8349		0,3314		6	0,0802		0,9660		15	0,0013		0,9995		10	0,0485		0,9778	
10q26.1	8400000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		3	0,7802		n.e.			1,0000		n.e.	
10q26.2	3100000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
10q26.3	4934747		1,0000		n.e.		1	0,6721		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
11p15	21700000	2	0,8532		0,2804		5	0,5419		0,6356			0,9826		0,0431	s	4	0,4263		0,7085	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
11p15.5	2800000	1	0,5399		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		0,2531		2	0,2365		n.e.	
11p15.4	7900000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		0,0202	s	1	0,9272		n.e.	
11p15.3	2000000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		0,3752			1,0000		n.e.	
11p15.2	3500000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		0,1793			1,0000		n.e.	
11p15.1	5500000	1	0,7829		n.e.			1,0000		n.e.		5	0,1342		0,9454		1	0,8382		n.e.	
11p14~15												1									
11p14	9300000	1	0,9250		0,2706			1,0000		0,1217		6	0,3043		0,8271		1	0,9543		0,1873	
11p13	5400000	4	0,0642		0,9821			1,0000		0,2951		3	0,4927		0,7277		2	0,5329		0,7353	
11p12	7100000	1	0,8611		0,4144		1	0,7993		0,5242		4	0,4582		0,7316			1,0000		0,0950	
11p11.2	5300000	11	0,0000	f	1,0000		4	0,0328		0,9926		6	0,0473		0,9838		3	0,2559		0,8997	
11p11.1	4900000	2	0,3932		0,8446			1,0000		0,3305		5	0,0942		0,9655		2	0,4814		0,7789	
11q11	2000000		1,0000		0,5746		1	0,3631		0,9246		3	0,0758		0,9826		2	0,1421		0,9707	
11q12	7700000	3	0,3588		0,8337		1	0,8249		0,4815			1,0000		0,0223	s	2	0,7227		0,5323	
11q13	13700000	8	0,0381		0,9852		9	0,0042		0,9988		10	0,1367		0,9249		16	0,0000	f	1,0000	
11q13~14												1									
11q14	15700000		0,9876		0,0673		3	0,2605		0,5265		3	0,9505		0,1149		2	0,9664		0,1079	
11q14.1	8500000	1	0,9061		0,3173			1,0000		n.e.		1	0,9850		n.e.			1,0000		n.e.	
11q14.2	2700000		1,0000		0,4731			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
11q14.3	4500000		1,0000		0,2868			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
11q21	4400000		1,0000		0,2949			1,0000		0,3692		1	0,8850		0,3650			1,0000		0,2331	
11q22	13200000	2	0,8817		0,2910		2	0,4391		0,4257		2	0,9892		0,0422	s	3	0,8120		0,3649	
11q23	10800000	7	0,0318		0,9890		3	0,1231		0,7732		9	0,0852		0,9590		4	0,0694		0,9714	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
11q23.1	2100000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		2	0,1534		n.e.	
11q23.2	2000000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
11q23.3	6700000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,8915		n.e.	
11q24	9600000	1	0,9310		0,2547			1,0000		0,1123			1,0000		0,0087	s	1	0,9587		0,1736	
11q25	4206516		1,0000		0,3112		7	0,0001	f	1,0000		3	0,3388		0,8476		1	0,7515		0,5953	
12p13.3	10100000		1,0000		n.e.		1	0,9677		n.e.		1	0,9933		n.e.		2	0,8472		n.e.	
12p13.2	2700000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
12p13.1	2000000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,6248		n.e.		1	0,4838		n.e.	
12p13	14800000	4	0,5870		0,6101		5	0,3844		0,7631		7	0,3004		0,8092		4	0,2203		0,8798	
12p12~13.1																	1				
12p12	11700000	1	0,9618		0,1641			1,0000		0,0187	s	2	0,9792		0,0728		1	0,9795		0,1006	
12p11.2~12.1							1														
12p11.2	6800000	3	0,2911		0,8788		6	0,0293		0,9910		2	0,8467		0,3522		4	0,1891		0,9232	
12p11.2~11.1		2															1				
12p11.1	2500000		1,0000		0,5001		3	0,0538		0,9892		5	0,0081		0,9984			1,0000		0,4375	
12q11	2400000		1,0000		0,5142		2	0,1951		0,9512			1,0000		0,3082			1,0000		0,4522	
12q12	8200000	1	0,8979		0,3364		1	0,9382		0,2346		2	0,9113		0,2337		1	0,9341		0,2459	
12q13	11700000	8	0,0170		0,9943		11	0,0024		0,9992		9	0,1222		0,9368		2	0,8994		0,2569	
12q13~14							1														
12q14	9600000	2	0,7453		0,5033		2	0,8361		0,3693		3	0,8503		0,3074		5	0,2134		0,8990	
12q14~15							1														

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
12q15	3800000		1,0000		0,3485		3	0,1389		0,9588		2	0,5554		0,7152			1,0000		0,2844	
12q15~21												1									
12q21	21100000		1,0000		0,0027	s	4	0,9272		0,1581		3	0,9982		0,0071	s	1	0,9991		0,0071	s
12q21~22							1														
12q22	3600000	1	0,6316		0,7372		2	0,3436		0,8762		7	0,0021		0,9996		7	0,0002		1,0000	
12q23	12800000		1,0000		0,0281	s		1,0000		0,0128	s		1,0000		0,0017	s		1,0000		0,0142	s
12q24	24851895	1	0,2524		0,8465		1	0,0820		0,9549		1	0,4419		0,6683		2	0,4367		0,6920	
12q24.1	5300000	2	0,4315		n.e.		5	0,0353		n.e.		8	0,0049		n.e.		3	0,2559		n.e.	
12q24.2	6400000	2	0,5294		n.e.			1,0000		n.e.		2	0,8217		n.e.			1,0000		n.e.	
12q24.3	13151895	3	0,4943		n.e.		6	0,1605		n.e.		2	0,9889		n.e.		4	0,6323		n.e.	
12q24.31	5200000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
12q24.32	3400000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
12q24.33	4551895	1	0,7173		n.e.		1	0,7861		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
13p13	4500000	1	0,7132		0,6461			1,0000		0,3619		2	0,6471		0,6223		2	0,4379		0,8126	
13p12	5500000		1,0000		0,2171			1,0000		0,2885			1,0000		0,0667			1,0000		0,1618	
13p11.2	6300000		1,0000		0,1736			1,0000		0,2406			1,0000		0,0448	s		1,0000		0,1240	
13p11.1	1600000		1,0000		0,6420			1,0000		0,6971			1,0000		0,4566			1,0000		0,5893	
13q11	1600000		1,0000		0,6420			1,0000		0,6971			1,0000		0,4566			1,0000		0,5893	
13q12	12700000	3	0,6842		0,5327		2	0,7814		0,4535		9	0,1721		0,9042		2	0,9230		0,2090	
13q13	7900000	2	0,6436		0,6262		1	0,8327		0,4678		2	0,9001		0,2560			1,0000		0,0728	
13q13~14												1									

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
13q14	15200000	5	0,4117		0,7536		11	0,0008		0,9998		13	0,0373		0,9819		5	0,5644		0,6125	
13q21	18000000		1,0000		0,0065	s	2	0,9146		0,2271		4	0,9778		0,0581		1	0,9975		0,0175	s
13q22	5700000	3	0,2103		0,9251		6	0,0020		0,9996		7	0,0230		0,9925		1	0,8486		0,4380	
13q31	16000000	2	0,9372		0,1788		1	0,9737		0,1229		2	0,9969		0,0144	s		1,0000		0,0048	s
13q32	6700000	2	0,5541		0,7164		3	0,1931		0,9339		12	0,0001		1,0000		2	0,6495		0,6191	
13q33	8600000		1,0000		0,0913			1,0000		0,1427		1	0,9857		0,0755			1,0000		0,0577	
13q34	4869878	5	0,0120		0,9975			1,0000		0,3328		3	0,4260		0,7834		5	0,0238		0,9940	
14p13	3700000		1,0000		0,3583			1,0000		0,4337			1,0000		0,1624		2	0,3454		0,8750	
14p12	4400000		1,0000		0,2949		1	0,6299		0,7389			1,0000		0,1150			1,0000		0,2331	
14p11.2	8000000		1,0000		0,1080			1,0000		0,1635			1,0000		0,0192	s		1,0000		0,0704	
14p11.1	1500000		1,0000		0,6600			1,0000		0,7130			1,0000		0,4796			1,0000		0,6091	
14q11.1	1500000		1,0000		0,6600			1,0000		0,7130			1,0000		0,4796			1,0000		0,6091	
14q11.2	5500000	3	0,1962		0,9323		3	0,1286		0,9632		1	0,9333		0,2485		2	0,5427		0,7264	
14q12	8700000	1	0,9112		0,3050			1,0000		0,1395			1,0000		0,0136	s		1,0000		0,0558	
14q13	4500000	3	0,1299		0,9627		1	0,6381		0,7306		8	0,0018		0,9996		3	0,1874		0,9365	
14q21	13100000		1,0000		0,0258	s	1	0,9489		0,2043		2	0,9887		0,0437	s	1	0,9872		0,0691	
14q22	7200000	3	0,3212		0,8595		4	0,0811		0,9756		1	0,9713		0,1314		6	0,0338		0,9893	
14q23	9800000	1	0,9348		0,2445			1,0000		0,1086		1	0,9922		0,0462	s		1,0000		0,0386	s
14q24	11400000	7	0,0406		0,9852		8	0,0047		0,9988		12	0,0109		0,9957		4	0,1781		0,9136	
14q24.1	2300000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,5326		n.e.	
14q24.2	3600000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
14q24.3	5500000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,8382		n.e.	
14q31	10500000	1	0,9464		0,2116		1	0,9074		0,3142		1	0,9945		0,0345	s	2	0,8621		0,3253	
14q31~32		1																			
14q32	17549540	2	0,9562		0,1341		2	0,7580		0,4406		4	0,6293		0,5102		2	0,9301		0,1678	
14q32.1	6500000		1,0000		n.e.		1	0,7701		n.e.		3	0,6175		n.e.		1	0,8840		n.e.	
14q32.2	5100000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
14q32.3	5949540		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,9466		n.e.			1,0000		n.e.	
15p13	3900000	3	0,0949		0,9761		3	0,1467		0,9555		1	0,8528		0,4305		1	0,7249		0,6309	
15p12	4800000		1,0000		0,2638			1,0000		0,1966			1,0000		0,0943			1,0000		0,2041	
15p11.2	7100000		1,0000		0,1389			1,0000		0,0899			1,0000		0,0301	s		1,0000		0,0950	
15p11.1	1500000		1,0000		0,6600			1,0000		0,6021			1,0000		0,4796			1,0000		0,6091	
15q11.1	1700000		1,0000		0,6244			1,0000		0,5626			1,0000		0,4347			1,0000		0,5701	
15q11.2	5000000		1,0000		0,2495		1	0,8163		0,4958		4	0,2300		0,8997		1	0,8090		0,5080	
15q12	2400000		1,0000		0,5142			1,0000		0,4439			1,0000		0,3082			1,0000		0,4522	
15q12~13							1														
15q13	5500000	3	0,1962		0,9323			1,0000		0,1550		3	0,5049		0,7169		2	0,5427		0,7264	
15q14	6500000		1,0000		0,1642		1	0,8897		0,3543			1,0000		0,0406	s		1,0000		0,1160	
15q15	4700000	4	0,0426		0,9896		3	0,2134		0,9233		7	0,0089		0,9976		8	0,0002		1,0000	
15q21	14300000	3	0,7584		0,4401		3	0,8627		0,2870		2	0,9933		0,0279	s	1	0,9914		0,0497	s
15q22	8400000	4	0,2048		0,9146		12	0,0000	f	1,0000			1,0000		0,0158	s	6	0,0620		0,9772	
15q23	5200000		1,0000		0,2360			1,0000		0,1716		1	0,9226		0,2767			1,0000		0,1787	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
15q24	5600000	3	0,2032		0,9287		3	0,2942		0,8766		8	0,0067		0,9981		4	0,1162		0,9604	
15q25	10800000	4	0,3501		0,8185			1,0000		0,0254	s	2	0,9696		0,0998			1,0000		0,0277	s
15q26	13431392	2	0,8876		0,2800		2	0,8329		0,3337		3	0,7885		0,3555		1	0,4562		0,7146	
15q26.1	5200000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		2	0,7233		n.e.			1,0000		n.e.	
15q26.2	4200000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
15q26.3	4031392		1,0000		n.e.		1	0,7448		n.e.			1,0000		n.e.		4	0,0459		n.e.	
16p13.3	7900000	5	0,0699		0,9765		3	0,2638		0,8954		4	0,5410		0,6559		4	0,2656		0,8770	
16p13.2	2600000		1,0000		0,4864			1,0000		0,5562		1	0,7207		0,6367			1,0000		0,4232	
16p13.1	6300000	3	0,2539		0,9011		1	0,7594		0,5846		5	0,1972		0,9093		3	0,3452		0,8429	
16p12	11300000		1,0000		0,0428	s		1,0000		0,0771		2	0,9754		0,0838			1,0000		0,0234	s
16p11.2~12												1									
16p11.2	6500000	4	0,1076		0,9644		3	0,1818		0,9394		5	0,2144		0,8987		5	0,0662		0,9780	
16p11.1	2000000		1,0000		0,5746			1,0000		0,6369		5	0,0032		0,9995		2	0,1421		0,9707	
16q11.1	2000000	3	0,0186		0,9975		2	0,0754		0,9892		2	0,2561		0,9242		2	0,1421		0,9707	
16q11.2	8400000	2	0,6764		0,5891		1	0,8507		0,4346		2	0,9181		0,2198		2	0,7658		0,4748	
16q12	9700000		0,0542		0,9808		6	0,0069		0,9982		4	0,0011		0,9997		1	0,0055		0,9983	
16q12.1	5600000	6	0,0050		0,9990		1	0,7180		n.e.		9	0,0019		n.e.		8	0,0006		n.e.	
16q12.2	4100000		1,0000		0,3206			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
16q13	700000		1,0000		0,8238		2	0,0112		0,9994		4	0,0004		1,0000		1	0,2065		0,9771	
16q21	9300000		1,0000		0,0750			1,0000		0,1217			1,0000		0,0101	s	2	0,8127		0,4063	
16q22	7400000	1	0,8723		0,3919		2	0,4974		0,7662		6	0,1567		0,9270		7	0,0123		0,9964	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
16q23	10100000	2	0,7701		0,4694		2	0,6652		0,6021		5	0,5508		0,6269		1	0,9650		0,1528	
16q24	6154753	6	0,0078		0,9982		4	0,0516		0,9866		2	0,8045		0,4193		5	0,0550		0,9826	
17p13	10700000	8	0,0105		0,9968		3	0,4338		0,7772		12	0,0069		0,9974		8	0,0273		0,9900	
17p12	5300000	2	0,4315		0,8177			1,0000		0,3019		4	0,2616		0,8799		1	0,8271		0,4772	
17p11.2	6200000	5	0,0300		0,9920			1,0000		0,2461		4	0,3599		0,8112		1	0,8718		0,3924	
17p11.1	1800000		1,0000		0,6073			1,0000		0,6663		2	0,2202		0,9408			1,0000		0,5516	
17q11.1	1800000	2	0,0894		0,9859		1	0,3337		0,9371		1	0,5861		0,7798			1,0000		0,5516	
17q11.2	6000000	4	0,0865		0,9734		3	0,1545		0,9521		4	0,3378		0,8275		2	0,5898		0,6817	
17q11.2~12		1																			
17q12	6300000	4	0,0989		0,9682			1,0000		0,2406			1,0000		0,0448	s	2	0,6163		0,6548	
17q21	12100000	2	0,8495		0,3477		7	0,0207		0,9934		10	0,0753		0,9631		4	0,5670		0,6297	
17q22	7400000	2	0,6081		0,6638			1,0000		0,1874		1	0,9740		0,1216		2	0,7022		0,5579	
17q22~23							1					1									
17q23	5000000	4	0,0513		0,9867		2	0,3108		0,8955		8	0,0035		0,9991		4	0,0855		0,9738	
17q24	8300000	2	0,6701		0,5965			1,0000		0,1528		1	0,9834		0,0852		1	0,9363		0,2399	
17q25	10295210	7	0,0255		0,9916		2	0,6754		0,5903		8	0,1343		0,9322		13	0,0000	f	1,0000	
18p11.3	7100000	4	0,1356		0,9514		5	0,0231		0,9942			1,0000		0,0301	s	1	0,4161		0,7907	
18p11.32	2900000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		0,2410		2	0,2487		n.e.	
18p11.31	4200000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		0,1269			1,0000		n.e.	
18p11.2	8300000	2	0,6701		0,5965		1	0,8472		0,4411		3	0,7733		0,4200		4	0,2947		0,8576	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
18p11.1	1800000	1	0,3927		0,9106			1,0000		0,6663		3	0,0592		0,9877			1,0000		0,5516	
18q11.1	1800000		1,0000		0,6073			1,0000		0,6663			1,0000		0,4139		1	0,4484		0,8801	
18q11.2	6000000	2	0,4951		0,7681		3	0,1545		0,9521		2	0,7930		0,4366		5	0,0504		0,9844	
18q11.2~12.1												2									
18q12	18500000	3	0,8881		0,2451			1,0000		0,0148	s	2	0,9990		0,0053	s	1	0,9979		0,0151	s
18q12~21		1																			
18q21	18100000	3	0,8792		0,2603		3	0,7761		0,4162		11	0,2734		0,8219		7	0,3900		0,7485	
18q22	11500000	1	0,9595		0,1713			1,0000		0,0737		3	0,9219		0,1841		2	0,8939		0,2675	
18q23	4977248	4	0,0506		0,9870		3	0,1034		0,9730		5	0,0989		0,9632		3	0,2277		0,9156	
19p13.3	6900000	3	0,2986		n.e.		1	0,7900		0,5390		8	0,0211		n.e.		9	0,0006		n.e.	
19p13.2	7000000	1	0,8572		n.e.		1	0,7947		0,5316			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
19p13.1	6100000	1	0,8164		n.e.		1	0,7482		0,6002		4	0,3489		n.e.			1,0000		n.e.	
19p13	20000000	3	0,1921		0,8945			0,8303		0,3383		6	0,0098		0,9954		1	0,1295		0,9293	
19p12	4400000		1,0000		0,2949			1,0000		0,3701			1,0000		0,1150		1	0,7669		0,5733	
19p11	2100000		1,0000		0,5588			1,0000		0,6227		3	0,0848		0,9796			1,0000		0,4994	
19q11	2100000		1,0000		0,5588			1,0000		0,6227		2	0,2741		0,9152			1,0000		0,4994	
19q12	3800000		1,0000		0,3485			1,0000		0,4240			1,0000		0,1546		2	0,3573		0,8677	
19q13.1	6300000	3	0,2539		0,9011		1	0,7594		0,5846		3	0,5964		0,6291		6	0,0192		0,9946	
19q13.2	4700000		1,0000		0,2713			1,0000		0,3458			1,0000		0,0991			1,0000		0,2110	
19q13.3	8000000	6	0,0248		0,9927		1	0,8365		0,4610		1	0,9808		0,0960		5	0,1277		0,9486	
19q13.4	7728983	2	0,6317		0,6391		1	0,8261		0,4795		3	0,7305		0,4762		2	0,7246		0,5299	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
20p13	5100000	3	0,1687		0,9457		3	0,1092		0,9709		4	0,2404		0,8933		1	0,8153		0,4976	
20p12	12800000		1,0000		0,0281	s		1,0000		0,0547		1	0,9983		0,0129	s	2	0,9251		0,2047	
20p11.2	7700000	1	0,8826		0,3703		1	0,8249		0,4815		3	0,7282		0,4791		2	0,7227		0,5323	
20p11.1	1900000	1	0,4093		0,9021			1,0000		0,6514		2	0,2381		0,9327			1,0000		0,5336	
20q11.1	1900000		1,0000		0,5907			1,0000		0,6514		1	0,6059		0,7619			1,0000		0,5336	
20q11.2	8200000	4	0,1935		0,9210		5	0,0392		0,9887		7	0,1096		0,9501		9	0,0018		0,9995	
20q12	4100000	1	0,6794		0,6863			1,0000		0,3962			1,0000		0,1333			1,0000		0,2574	
20q13	21325520		0,8437		0,2947		1	0,3494		0,7922		1	0,1018		0,9399			0,2750		0,8285	
20q13.1	8100000	2	0,6570		0,6113		3	0,2759		n.e.		7	0,1045		n.e.		4	0,2801		0,8675	
20q13.2	5200000		1,0000		0,2360			1,0000		n.e.		2	0,7233		n.e.		2	0,5127		0,7529	
20q13.3	8025520	2	0,6521		0,6169		2	0,5407		n.e.		5	0,3562		n.e.		3	0,4948		0,7253	
21p13	2800000	3	0,0435		0,9920			1,0000		0,5316		1	0,7469		0,6021		1	0,6039		0,7635	
21p12	4000000		1,0000		0,3296			1,0000		0,4052			1,0000		0,1401			1,0000		0,2661	
21p11.2	4100000		1,0000		0,3206			1,0000		0,3962			1,0000		0,1333			1,0000		0,2574	
21p11.1	2300000		1,0000		0,5287			1,0000		0,5952			1,0000		0,3237			1,0000		0,4674	
21q11.1	1100000		1,0000		0,7374			1,0000		0,7804			1,0000		0,5836			1,0000		0,6953	
21q11.2	2100000	4	0,0029		0,9997			1,0000		0,6227		2	0,2741		0,9152			1,0000		0,4994	
21q21	15100000		1,0000		0,0147	s		1,0000		0,0323	s	3	0,9795		0,0605		1	0,9934		0,0398	s
21q22	16629895	2	0,3136		0,8200		3	0,7252		0,4829		1	0,8262		0,2923		1	0,9131		0,2001	
21q22.1	8200000	2	0,6636		n.e.			1,0000		n.e.		4	0,5704		n.e.			1,0000		n.e.	
21q22.2	2900000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
21q22.3	5529895	2	0,4529		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,9343		n.e.		2	0,5456		n.e.	
22p13	3800000	2	0,2832		0,9105		1	0,5760		0,7886			1,0000		0,1546			1,0000		0,2844	
22p12	4500000		1,0000		0,2868			1,0000		0,3619			1,0000		0,1094			1,0000		0,2254	
22p11.2	3900000		1,0000		0,3389			1,0000		0,4145			1,0000		0,1472			1,0000		0,2751	
22p11.1	2500000		1,0000		0,5001			1,0000		0,5689			1,0000		0,2934			1,0000		0,4375	
22q11.1	3200000	2	0,2221		0,9399			1,0000		0,4856			1,0000		0,2079			1,0000		0,3470	
22q11.2	8000000	4	0,1824		0,9271			1,0000		0,1635		6	0,1996		0,9004		3	0,4927		0,7272	
22q12	11700000	1	0,9618		0,1641			1,0000		0,0704		2	0,9792		0,0728			1,0000		0,0205	s
22q12~13					1,0000		1														
22q13	13704566	2	0,8942		0,2674			0,8159		0,4020		4	0,2301		0,8631		1	0,9414		0,1686	
22q13.1	3400000		1,0000		n.e.			1,0000		0,4642		1	0,8117		n.e.		1	0,6753		n.e.	
22q13.2	3200000		1,0000		n.e.			1,0000		0,4856			1,0000		n.e.			1,0000		n.e.	
22q13.3	7104566		1,0000		n.e.		2	0,4761		0,7836		4	0,4586		n.e.			1,0000		n.e.	
Xp22	24900000	2	0,5361		0,6155		4	0,6060		0,0753		2	0,2387		0,8382		1	0,5799		0,5611	
Xp22.3	9500000	1	0,9291		n.e.		3	0,6237		n.e.		3	0,8453		n.e.		6	0,0973		n.e.	
Xp22.2	7600000		1,0000		n.e.			1,0000		n.e.		1	0,9765		n.e.			1,0000		n.e.	
Xp22.1	7800000	4	0,1716		n.e.		1	0,9292		n.e.		9	0,0154		n.e.		1	0,9247		n.e.	
Xp21	12700000	3	0,6842		0,5327			1,0000		0,0133	s	4	0,8706		0,2536		2	0,9230		0,2090	
Xp11.4	4800000	3	0,1489		0,9546		4	0,0814		0,9754		4	0,2095		0,9118		1	0,7959		0,5293	
Xp11.3	4000000		1,0000		0,3296			1,0000		0,2580			1,0000		0,1401		1	0,7339		0,6192	

Suspension		**FA_{1B}**					**FA_{2B}**					**FA_{3B}**					**FA_{4B}**				
Region	Bandengröße	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?	k	Pi	f?	Pd	s?
Xp11.2	11700000	2	0,8359		0,3701		2	0,9065		0,2429		4	0,8261		0,3205		3	0,7431		0,4594	
Xp11.1	2500000	3	0,0329		0,9946		2	0,2074		0,9462		7	0,0003		1,0000		4	0,0100		0,9984	
Xq11	4000000		1,0000		0,3296			0,7420		0,6083			0,0479		0,9855			0,3808		0,8526	
Xq11.1	2400000		1,0000		0,5142		1	0,5561		0,8049		5	0,0069		0,9987		1	0,5478		0,8116	
Xq11.2	1600000		1,0000		0,6420			1,0000		0,5820			1,0000		0,4566		1	0,4107		0,9012	
Xq11~12		1																			
Xq12	3200000		1,0000		0,4117			1,0000		0,3384		1	0,7921		0,5357		2	0,2851		0,9093	
Xq13	8200000	6	0,0275		0,9917		7	0,0227		0,9926		8	0,0499		0,9795		6	0,0566		0,9797	
Xq21	22300000	1	0,9981		0,0140	s		1,0000		0,0005	s	1	1,0000		0,0002	s	2	0,9951		0,0214	s
Xq22	10400000	2	0,7840		0,4497		12	0,0003		0,9999		7	0,2486		0,8602		10	0,0027		0,9992	
Xq23	7800000	1	0,8858		0,3633			1,0000		0,0708		1	0,9787		0,1039			1,0000		0,0753	
Xq24	4400000		1,0000		0,2949		2	0,4382		0,8124		3	0,3645		0,8297		2	0,4267		0,8209	
Xq25	7800000	1	0,8858		0,3633			1,0000		0,0708		1	0,9787		0,1039			1,0000		0,0753	
Xq25~26												2									
Xq26	9300000	2	0,7294		0,5242		2	0,8228		0,3906		3	0,8349		0,3314		4	0,3688		0,8040	
Xq26~27							1					2									
Xq27	9100000	1	0,9206		0,2817		1	0,9546		0,1866		6	0,2874		0,8396		2	0,8031		0,4209	
Xq27~28												2					1				
Xq28	8170560	3	0,3939		0,8081		7	0,0223		0,9928		2	0,9103		0,2359		6	0,0558		0,9800	
Σ Brüche		868					746					1534					1036				
Σ fragile bzw. stabile Banden				6		32			10		27			10		59			10		37

Tab. 8.15: Übersicht zur Zahl von Flexibilitäts-Peaks pro Mbp und der durchschnittlichen Flexibilität der einzelnen Abschnitte der kartierten FSs.

Fragile Site (mittlere Flexibilität der FS)	**Region der FS**	**Lokalisation in bp**	**Peaks pro Mbp**	**Flexibilität der Region der FS (Standardabweichung)**
FRA1B (10,81°)	Proximale Grenze	55 123 805 - 55 905 370	16,63	10.59° (0.66°)
	Zentrum	55 905 371 - 61 418 672	46,80	10.84° (0.69°)
	Distale Grenze	61 418 673 - 62 501 834	47,08	10.81° (0.68°)
FRA1D (10,87°)	Proximale Grenze	87 677 974 - 88 319 382	21,83	10.85° (0.66°)
	Zentrum	88 319 383 - 91 687 502	44,83	10.89° (0.68°)
	Distale Grenze	91 687 503 - 92 659 879	20,57	10.80° (0.71°)
FRA1F (10,66°)	Proximale Grenze	145 768 518 - 146 871 193	34,46	10.75° (0.63°)
	Zentrum	146 871 194 - 153 838 214	39,90	10,66° (0,69°)
	Distale Grenze	153 838 215 - 154 067 677	26,15	10.49° (0.68°)
FRA1G (10,83°)	Proximale Grenze	169 782 106 -171 863 203	36,52	10,89° (0,68°)
	Zentrum	171 863 204 - 177 292 468	43,47	10,83° (0,69°)
	Distale Grenze	177 292 469 - 180 436 544	65,20	10.79° (0.70°)
FRA1K (10,96°)	Proximale Grenze	190 628 094 - 192 576 285	120,11	11.16° (0.74°)
	Zentrum	192 576 286 - 202 329 453	71,36	10.94° (0.76°)
	Distale Grenze	202 329 454 - 202 859 974	16,96	10.62° (0.68°)

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat./med. habil. Thomas Liehr für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und die gute Betreuung während der Durchführung der Promotion.
Auch möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Kristin Mrasek sowie Frau Dr. rer. nat. Anja Weise, die meine Arbeit ebenfalls betreuten, für die anregenden Diskussionen, die Überprüfung der zytogenetischen bzw. molekular-zytogenetischen Auswertungen und die Hilfe bei aufkommenden methodischen Fragestellungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den Fanconi Anämie Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben. Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Zudem möchte ich mich bei der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. und im Besonderen bei Herrn und Frau Dietrich, Frau Schmitt und Frau Heun für die Organisation der Selbsthilfegruppen-Treffen und meine Einladung zu selbigen bedanken. Sie haben es mir ermöglicht Betroffene kennenzulernen, deren persönlichen Sorgen aber auch deren Kraft und Mut zu erfahren. Die Lebensfreude, die auf den Treffen vorherrschte, war mir eine besondere Motivation. Ich bedanke mich auch bei den Wissenschaftlern, die ebenfalls an den Selbsthilfegruppen-Treffen teilnahmen, für den regen Austausch. Mein Dank gilt hierbei im Besonderen Prof. Dr. rer. nat. Neitzel für die anregende Diskussion zur Kultivierung von Fanconi Anämie Zellen sowie Prof. Dr. med Hanenberg und Prof. Dr. med. Schindler für die Bestimmung der Komplementationsgruppen der Studienteilnehmer.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Im Besonderen möchte ich mich bei Frau Dr. Schreyer für die Betreuung während meiner Famulaturen, den Einblick in die humangenetische Beratung und die Ermutigung zur Durchführung der Promotionsarbeit bedanken. Auch danke ich den Mitarbeiterinnen der AG Zytogenetik und Karyotypevolution im besonderen Maße für die Einarbeitung in die Technik der Zellkultivierung und der Zellpräparation. Zudem bedanke ich mich außerordentlich bei den Mitarbeiterinnen der AG Molekulare Zytogenetik Katharina Kreskowski, Beate Pohle und Monika Ziegler für die Hilfe im Labor und bei der Arbeit an den Mikroskopen. Mein Dank gilt auch allen Post-Docs, Doktoranden, Diplomanden, Bachelor-Studenten und Forschungsgästen der AG für die schöne gemeinsame Zeit. Namentlich möchte ich Samarth Bhatt, Nancy Blaurock, Ahmed Basheer Hamid, Philipp Kempf, Vivien Klaschka, Elisabeth Klein, Nadja Kosyakova, Christine Leibiger, Amelie Lier, Marina Manvelyan, Hasmik Mkrtchyan, Anne

Teichmann, Rebecca Wagner und Cornelius Wölfel danken. Ich danke zudem besonders den Mitarbeitern, die als Kontrollperson an der Studie mitgewirkt haben. Auch möchte ich mich bei der Sekretärin des Instituts Anja Kirschner für ihre Hilfe bedanken.

Ich danke dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) Jena für die Förderung meiner Arbeit mit einem Promotionsstipendium.

Für die Hilfe beim Programmieren mit „C“ danke ich Fabian Marr.

Schließlich möchte ich mich bei allen meinen Lieben für die mir während meines Studiums und meiner Promotion entgegengebrachte Unterstützung bedanken, allen voran bei meinen Eltern, meinen Großeltern und meinem Freund Fabian. Ihr habt all das möglich gemacht. Dafür danke ich Euch von ganzem Herzen.

Jena im November2013

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr PD Dr. rer nat. / med. habil, Dr. h.c. T. Liehr, Frau Dr. rer. nat. K. Mrasek, Frau Dr. rer. nat. A. Weise.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistung von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena im November 2014